

Beiträge zur Analytik der Mutterkornalkaloide

Der Nachweis von Ergotamin neben Ergocristin

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität
zu Mainz

GERD KESSLER

Mainz 1954

BEITRÄGE ZUR ANALYTIK DER MUTTERKORNALKALOIDE:

Der Nachweis von Ergotamin neben Ergocristin.

D i s s e r t a t i o n

z u r E r l a n g u n g d e s D o k t o r g r a d e s

bei der Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Johannes Gutenberg-Universität

zu Mainz

eingereicht von

G e r d K e s s l e r

geboren in Saarbrücken

Mainz 1954

Dekan: Prof. Dr. H. Rohrbach

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Rochelmeyer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Kuschinsky

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Mai 1954

Meinen lieben Eltern !

Es sei mir gestattet, an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. H. Rochelmeyer, sowohl für die Überlassung des Themas als auch für die großzügige Förderung und Betreuung der Arbeit meinen tiefempfundenen Dank auszusprechen.

Die Arbeit wurde durch die Bereitstellung von ERP-Mitteln ermöglicht.

Der Bedarf an Mutterkornalkaloiden in der Medizin ist infolge der Ausweitung der Indikationsgebiete in den letzten Jahren erheblich angestiegen. Die Versorgung mit diesen wichtigen Rohstoffen durch die pharmazeutische Industrie war nicht immer ausreichend. Zur Erklärung dieser Tatsache kann man verschiedene Gründe anführen. Da die leicht zersetzlichen Wirkstoffe des Mutterkorns meist zu mehreren vergesellschaftet in der Droge vorkommen und ihre Trennung umständlich und verlustreich ist, bringt die Isolierung und Reindarstellung im technischen Maßstab große Schwierigkeiten mit sich. Das hat dazu geführt, daß verhältnismäßig nur wenig pharmazeutische Industriebetriebe die Darstellung von Reinalkaloiden aus Mutterkorn betreiben. Dazu kommt, daß bis vor einigen Jahren als einziges Ausgangsmaterial für diesen Prozeß wild gewachsenes Mutterkorn zur Verfügung stand. Diese Droge ist aber durch ihren schwankenden Gehalt an Wirkstoffen sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Hinsicht ungeeignet, eine rationelle Produktion zu ermöglichen. Erst die parasitische Kultur von *Claviceps purpurea* auf Roggen schuf die Voraussetzung für die Erzeugung einer Droge mit gleichmäßig hohem Alkaloidgehalt. Naheliegend erschien weiter der Gedanke, Pilzstämme zu züchten, welche möglichst jeweils nur einen einzigen Wirkstoff produzieren und damit die umständliche und verlustreiche Auftrennung eines Alkaloidgemisches überflüssig machen würden.

Auch für die galenische Pharmazie hat die parasitische Mutterkornkultur entscheidende Bedeutung. Hier war das in vielen Arzneibüchern aufgenommene *Extractum Secalis cornuti fluidum* lange Zeit das wichtigste galenische Mutterkornpräparat. Die Schwankungen in der Wirksamkeit dieser Zubereitung, welche hauptsächlich durch die verschiedenen Drogensorten und die Unbeständigkeit der

Alkaloide in Lösung bedingt werden, sind zur Genüge bekannt. Wenn eine galenische Mutterkornzubereitung in der modernen Therapie Aufnahme finden soll, so muß gefordert werden, daß das Lösungsmittel nur eine möglichst kurze Zeit mit den Alkaloiden in Berührung gebracht wird. Also heißt die Aufgabe, einen Trockenextrakt aus Mutterkorn zu gewinnen, welcher in jeweiligen Anteilen bei Bedarf in gelöste Form übergeführt werden kann. Dieser Extrakt muß die Wirkstoffe quantitativ wie auch qualitativ in gleichbleibender Menge und in wirksamer, stabiler Form enthalten. Damit erhebt sich wieder die Forderung nach einem entsprechenden Ausgangsmaterial, also nach einer Droge mit hohem Alkaloidgehalt und gleichbleibender Zusammensetzung der enthaltenen Wirkstoffe. Eine solche Droge kann nur erzeugt werden, wenn die Alkaloidproduktion von *Claviceps purpurea* bei der Bildung der Sklerotien sowohl quantitativ als auch qualitativ in erster Linie genetisch bedingt ist. In diesem Falle wäre die Produktion einzelner Alkaloide oder bestimmter Alkaloidkombinationen als entscheidendes Rassenmerkmal anzusehen. Aus der Literatur über die Systematik und Biologie der Clavicipiteen ergaben sich zu Beginn vorliegender Arbeit folgende Hinweise zu der Frage, ob zur Differenzierung von Rassen Besonderheiten des Stoffwechsels als genetische Merkmale herangezogen werden können.

Zu Anfang des 19. Jahrhunderts lagen Kenntnisse über den Pilz *Claviceps purpurea*, insbesondere seinen Entwicklungsgang und seine Fortpflanzung, noch nicht vor, obwohl sich bis dahin schon einige Botaniker mit dem Auftreten des Mutterkorns auf Roggen befaßt und mehrere Theorien über die Ursache dieser Erscheinung beim Getreide aufgestellt hatten. Man hielt das Mutterkorn für eine krankhafte Wucherung des Fruchtknotens oder auch des Perisperms, des Scutellums oder der Integumente. M. Field (1) hielt Insektenstiche für die Ursache der Krankheit und zahlreiche andere Autoren glaubten kleine Nematoden

oder ähnliches zu finden, welchen sie eine Rolle bei der Entstehung der schwarzen Körner zuschrieben. A. Schumacher (2) beobachtete als Erster richtig, daß ein Pilz die Bildung des Mutterkorns verursacht; er stellte fest, daß dieser auf verschiedenen Gräsern leben kann und gab eine kurze Beschreibung in seinem Pflanzen-Syllabus. Allerdings erkannte er zweifellos nicht, daß es sich um die Gattung *Claviceps* handelte, denn er ordnete den Pilz unter *Sphoeria entomorrhiza* Dickson ein. M. De Candolle (3) äußerte gleichfalls die Ansicht, daß es sich um einen Pilz handeln könnte; er gruppierte diesen unter der Gattung "Sklerotium" richtig ein.

Als Erster studierte M. L.-R. Tulasne (4) eingehend Morphologie und Biologie des Pilzes *Claviceps*. Sein Verdienst ist es, den geschlossenen Entwicklungszyklus des Pilzes aufgeklärt und dargestellt zu haben. Er untersuchte das Verhalten des Parasiten auf Roggen und erkannte das Sklerotium als Überwinterungsform des Pilzes. Ferner beschrieb er die Vermehrung durch Ascosporen, deren Entstehung ein Sexualakt vorausgeht, ausführlich und gab eine umfassende morphologische Beschreibung des Sphacelia-Stadiums und der Konidien, welche von fast allen späteren Autoren übernommen wurde. Er untersuchte die Keimung der Sklerotien, deren Beobachtung ihn überhaupt erst zur sicheren Identifizierung des Pilzes führte. Hierbei waren Morphologie und Anatomie der Stromata und Perithezien von entscheidender Bedeutung für seine systematischen Entscheidungen.

Gleichzeitig erstreckten sich seine Untersuchungen auf Mutterkorn, welches er auf anderen Gramineen beobachtete⁺). Auf Grund dieser Arbeiten beschreibt M. L.-R. Tulasne schließlich drei Arten, die sich morphologisch und anatomisch deutlich unterscheiden: *Claviceps purpurea*, *Claviceps microcephala* und *Claviceps nigricans*.

⁺) Man bezeichnet heute auf Roggen vorkommende Sklerotien auch als Roggen-Mutterkorn, während die auf anderen Gramineen auftretenden Sklerotien als Gras-Mutterkorn bezeichnet werden.

R. Stäger (5) griff 1903 das Problem der Wirtspflanzenspezifität auf. Er wollte die Frage, ob Arten oder Rassen von *Claviceps* dadurch unterschieden werden können, daß sie bestimmte Wirtspflanzen aufsuchen und andere überhaupt nicht befallen, experimentell untersuchen. Zur Infektion verwendete er sowohl Honigtau entweder in der Natur befallener oder künstlich infizierter Gräser, als auch Ascosporen, welche letztere er aus keimenden Sklerotien gewann. Die gemachten Beobachtungen wertete R. Stäger dahingehend aus, daß er von *Claviceps purpurea* Tul. drei biologische Formen nach ihrer Wirtsspezifität unterschied. Zunächst *Claviceps purpurea* Tul., forma *specialis secalis*, welche in der Hauptsache auf Roggen anzutreffen ist, aber auch Gerste, *Anthoxanthum*, *Dactylis* und zahlreiche andere Gräser mehr belegen kann. Eine weitere biologische Form ist die auf *Lolium*-Arten angetroffene. Nach seinen Beobachtungen waren Konidien oder Ascosporen dieser Varietät nur in der Lage, *Lolium*-Arten und *Bromus erectus* zu belegen. Weiterhin hatte er bei *Claviceps purpurea* noch eine dritte biologische Form festgestellt, welche auf *Brachypodium silvestris* vorkommend auf *Milium effusum* überwechselt. Eine weitere Type wurde von ihm auf *Anthoxanthum* beobachtet, welche nur auf diesem Gras Sklerotien auszubilden vermochte. Sie läßt sich zwar auf andere Gräser übertragen, entwickelt sich dort zum *Sphaceliastadium* mit der Absonderung von Honigtau, bildet jedoch niemals Sklerotien. Auch bei der Art *Claviceps microcephala* unterschied er zwei biologische Formen. Die erste, auf *Phragmites* gefunden, ist in der Lage, auf *Molinia*, *Nardus* und *Aira* überzugehen. Eine zweite Form, auf *Poa annua* vorkommend, wurde nur auf diesem Gras beobachtet.

Die Eigenart, bestimmte Pflanzen als Wirte zu bevorzugen, führte neben anderen Eigenschaften zur systematischen Unterteilung zahlreicher Arten oder Rassen der Clavicipiteen. So gibt G. Barger (6) in seiner Monographie "Ergot and Ergotism" außer den drei von M. L.-R. Tulasne (4) beschriebenen Species *Claviceps purpurea*, *Claviceps microcephala* und *Claviceps nigricans* noch *Claviceps pusilla*, *Claviceps setulosa*, *Claviceps Wilsoni*, *Claviceps sesleriae* und *Claviceps Junci* als europäische Vertreter an. Von den auf dem amerikanischen Kontinent aufgefundenen Arten nennt er zwölf: *Claviceps paspali*, *Claviceps Rolfsii*, *Claviceps Phillippii*, *Claviceps balansioides*, *Claviceps lutea*, *Claviceps ranunculoides*, *Claviceps Uleana*, *Claviceps Patouillardiana*, *Claviceps pallida*, *Claviceps cinerea*, *Claviceps Tripsaci* und *Claviceps* (?) *caricina*. Weiter gibt der Autor eine übersichtliche Zusammenstellung der von dem Pilz überhaupt befallenen Wirtspflanzen.

Eine solche Wirtsspezifität als Rassenmerkmal könnte theoretisch so zustande kommen, daß beispielsweise schon der unterschiedliche Bau der verschiedenen Grasblüten eine Infektion für die eine oder andere Varietät schwieriger machen könnte. Es besteht auch die Möglichkeit, daß die mit der Wirtspflanze der Pilzrasse angebotenen Stoffwechselprodukte Unterschiede aufweisen, die für den einen oder anderen Vertreter der Clavicipiteen mehr oder weniger brauchbar sind. Andererseits ist auch durchaus denkbar, daß von dem Pilz an die Wirtspflanze abgegebene Stoffwechselprodukte eine Rolle spielen können. Auf alle Fälle wäre es ein wesentlicher Fortschritt in der Erforschung der Biologie der Clavicipiteen, eine solche Wirtsspezifität in ihrer Ursache zu erkennen.

Die Schlüsse, welche R. Stäger aus seinen Untersuchungen zog, können jedoch bei einer kritischen Betrachtung

nicht als zwingend gelten. Natürlich vorkommende Pilze oder auch Bakterien sind stets Mischrassen. So ist die von den natürlich vorkommenden Milchsäurebakterien gebildete Milchsäure stets die inaktive Form, während herangezüchtete reine Rassen entweder die d-Milchsäure oder die l-Form produzieren (7). Als weiteres Beispiel sei *Ustilago zeae* angeführt. Dieser Pilz spaltet sich nach E. Gäumann (8) in unendlich viele Biotypen mit unterschiedlicher Wirtswahl. Daher dürfte es sehr unwahrscheinlich sein, daß Individuen desselben Biotyps auf einer Wirtspflanze zusammentreffen, vielmehr werden die mannigfaltigsten Kombinationen eintreten, und der Sporensatz einer einzigen Brandbeule wird in der Regel eine wirre Population darstellen. Mit ähnlichen Verhältnissen muß auch bei den Clavicipiteen gerechnet werden.

R. Stäger gewann sein Impfmateriel, wie bereits erwähnt, indem er Sklerotien auskeimen ließ und die entwickelten Ascosporen auf Gramineen aufsprühte oder den Honigtau schon belegter Pflanzen zur weiteren Infektion nahm. Somit war keine Sicherheit vorhanden, daß die Ascosporen oder Konidien genetisch einheitlich waren, und mußte deshalb seine Infektionstechnik mit Wahrscheinlichkeit zu Mischinfektionen führen.

Es ist auch daran zu denken, daß die Anpassungsbreite einer biologischen Art an verschiedene Substrate groß ist. Erfahrungsgemäß kann man die meisten Pilze im Laboratorium über mehrere Generationen hinweg an ein neues Nährmedium gewöhnen. So wurden z.B. im Sommer 1953 in Mainz 54 Roggenpflanzen im Gewächshaus und 77 im Freiland mit Konidien einer Type von *Claviceps purpurea* erfolgreich beimpft, welche in der Natur von Gräsern auf Gerste übergegangen war. Während erste Übertragungsversuche in den Jahren vorher scheiterten, wurde der Pilz durch fortwährende saprophytische Passagen auf Roggennährböden umgewöhnt. Alle belegten Roggenpflanzen zeig-

ten dann reichliche Honigtaubildung und brachten normal ausgebildete Sklerotien hervor.

Ferner gelang es in gleicher Weise, Pilzmycel, welches von Mutterkörnern, gewachsen auf *Holcus*-Pflanzen, stammte, mittels Konidien auf Roggenpflanzen erfolgreich zu übertragen und den Pilz dort zur Sklerotienbildung zu veranlassen.

Eine weitere Frage ist, ob das Beobachtungsmaterial von R. Stäger umfassend genug ist. So wurde im Gegensatz zu diesem Autor beobachtet, daß auch *Melica nutans* in der Natur von *Clavicipiteen* befallen wird (9). Ferner wurden Standorte von *Brachypodium* gefunden, die in der näheren Umgebung kein Vorkommen von *Milium*-Pflanzen zeigten. Die an *Brachypodium* auftretenden Sklerotien konnten daher kaum von *Milium* übertragen worden sein. E. Fischer und E. Gäumann (10) weisen in diesem Zusammenhang auch darauf hin, daß bei der auf *Brachypodium* vorkommenden Species der Wirtswechsel von *Milium* auf *Brachypodium* durchaus fakultativ sein könne, denn es bestehe keine Spezialisierung auf eine der beiden Wirtsgruppen. Lediglich durch die unterschiedliche Blühdauer der beiden Wirte wird der Wechsel obligatorisch: "Das Nacheinander des Wirtswechsels wird also nicht durch innere Gründe des Parasiten hervorgerufen, sondern durch innere Gründe der Wirte".

Andererseits sei an dieser Stelle auf V. Grasso (11) verwiesen, welcher sich ebenfalls mit dem Problem der Wirtsspezifität der *Clavicipiteen* beschäftigt. Er kommt zu der Schlußfolgerung, daß auf Grund seiner eingehenden Infektionsversuche die Species *Claviceps purpurea* mit *Claviceps microcephala*, *Claviceps sesleriae* und *Claviceps setulosa* physiologisch identisch seien und daher die drei letztgenannten nur als Synonyma der Gattung *Claviceps purpurea* Tul. aufzufassen seien.

Eine Wirtsspezifität als Rassenmerkmal erscheint zu=

nächst denkbar. Die Möglichkeit der Umgewöhnung an andere Substrate bedeutet jedoch eine erhebliche Einschränkung der systematischen Verwendung dieser Eigenschaft. Experimentelle Untersuchungen in dieser Richtung erfordern aber als erste Voraussetzung ein genetisch einheitliches Ausgangsmaterial.

Nachdem die mikroskopische Technik gestattete, Einsporkulturen anzulegen, bestand die Möglichkeit der Züchtung von Klonen. Diese sind als vegetative Abkömmlinge einer gegebenenfalls einkernigen Spore als genetisch identisch anzusprechen. Mit einem derartigen Material wären also die Versuche von R. Stäger zu wiederholen, um zu exakten Ergebnissen zu kommen.

Eine andere Stoffwechseleigentümlichkeit stellt bei den meisten Clavicipiteen die Fähigkeit der Farbstoffbildung zur Zeit der Umwandlung des Mycel in das Sklerotium dar. H. Kirchhoff (12) vermutet bei den sogenannten Leukosklerotien in der Unterdrückung der Farbstoffbildung eine Rasseneigentümlichkeit. Bei seinen parasitischen Züchtungen aus Leukosklerotien erhielt er neben farblosen auch normal gefärbte Mutterkörner. Diesen Versuchen schrieb er grundlegende Bedeutung zu, da er an ein Aufspalten im Sinne der Vererbungsgesetze dachte. Ob die Anlage für das Fehlen des Farbstoffes rezessiven Charakter hat, und wie sie genetisch verankert ist, darüber können ebenfalls nur Züchtungsversuche mit erblich einheitlichem Material Aufschluß geben.

H. Kirchhoff erwähnt ferner, daß das Auftreten verschiedener Wuchsformen des Pilzes auf künstlichen Nährsubstraten ebenfalls erblich bedingte Ursachen haben dürfte. Diese unterschiedlichen Wuchsformen in saprophytischer Kultur hat auch J. Krebs (13) beobachtet und beschrieben. Jedoch schließt das von ihm verwendete Pilzmaterial wie dasjenige H. Kirchhoffs (12) und früherer Autoren (14,15) Rassengemische nicht aus und bedingt damit eine erhebliche Wertminderung dieser Versuchsergebnisse.

Auch J. Krebs (13) beobachtete bei seinen verschiedenen Abimpfungen nicht nur anatomische Unterschiede der Sphäridien, eine Wirtsspezifität und den unterschiedlichen Habitus der saprophytischen Kulturen, sondern auch differenzierte Nährstoffansprüche. Von Roggenmutterkorn abgeimpfte Stämme zeigten nur auf Rohrzucker-Asparagin-Agar eine gute Entwicklung, während auf anderen Gräsern parasitierende Arten von *Claviceps purpurea* nur auf Malz-Agar gut gediehen. Die Unterschiede von Stämmen, die der gleichen Art angehören, waren in der Kultur sehr augenfällig. Besonders der Einfluß der Temperatur wirkte sich stark auf das Mycelwachstum auf Nährböden und in Nährlösungen aus. Das Wachstumsoptimum der verschiedenen Typen lag bei verschiedenen Temperaturpunkten. Lediglich die Temperatur, bei der das Wachstum zum Stillstand kam, lag bei allen untersuchten Stämmen gleichmäßig bei ungefähr 33° . Auch die Ansprüche des Mycels hinsichtlich des P_H -Wertes des Nährsubstrates waren stark unterschiedlich.

Wie diese Beispiele zeigen, können isolierte Rassen ein vom Rassengemisch unterschiedliches Verhalten an den Tag legen. Es ist überhaupt die Frage, ob eine systematische Erfassung und Einordnung solcher in ihrer Physiologie sich unterscheidenden Typen möglich ist. E. Fischer und E. Gäumann (10) schlugen zur Systematik vor, die Ausdrücke Stamm, Klon und strain auf Einsporkulturen zu beschränken und unter Rassen, Biotypen und Varianten diejenigen höheren Einheiten zu verstehen, welche eine Gruppe von gleichartigen Einsporkulturen bzw. -isolierungen, also eine Gruppe von identischen "Stämmen", zusammenfassen. Biologische Rassen, Varianten, Klone usw. lassen sich durch variationsstatistische Methoden nicht mehr unterscheiden, wohl aber biologisch, indem sie z.B. ihre Wirte in unterschiedlicher Weise befallen. Mit diesen Unterschieden können naturgemäß auch andere differentialdiagnostische Merkmale einhergehen wie unterschiedliche Temperaturansprüche oder bestimmte Wachstumseigentümlichkeiten.

keiten auf künstlichen Substraten oder geringfügige morphologische Unterschiede, die für die Abtrennung einer besonderen Varietät oder einer Unterart noch nicht ausreichen.

E. Fischer und E. Gäumann (10) schlugen weiterhin vor, Pilzstämme, welche eine solche Verfeinerung der Wirtswahl aufweisen, daß sie nicht nur phanerogamische Arten, sondern auch phanerogamische Rassen bzw. Züchtungen unterscheiden, als biologische Rassen zu bezeichnen. Der Unterschied zwischen biologischen Arten und biologischen Rassen, der in der Literatur nicht konsequent durchgeführt ist, liege hier in der feinsten physiologischen Aufspaltung der systematischen Einheiten, wie man ja auch in der Physiologie von physiologischen Rassen zu sprechen pflegt. Physiologische Rassen des Mutterkorns sind nach E. Gäumann (8) solche, die sich bei morphologischer und anatomischer Identität im Stoffwechselgeschehen (Nährstoffansprüche) unterscheiden.

Daß auch die Bildung der Alkaloide als Ausdruck eines bestimmten Teilgeschehens im Stoffwechsel an die Erbanlagen gebunden ist, kann als wahrscheinlich gelten. Ob das Entstehen jedes einzelnen Alkaloids jeweils in einem einzigen Gen verankert ist oder ob mehrere Gene in einem oder verschiedenen Chromosomen für die Wirkstoffentstehung verantwortlich zu machen sind, ist dabei zunächst von zweitrangiger Bedeutung. Dagegen ist aus praktischen Gründen interessant zu wissen, ob die Erzeugung der Basen quantitativ und qualitativ jeweils für sich erbgelinkt ist oder ob die Produktion bestimmter Alkaloide oder Alkaloidkombinationen das quantitative Geschehen schon in sich determiniert trägt.

Die ersten bestimmten Angaben bezüglich der Abhängigkeit der quantitativen Alkaloidproduktion von den Erbanlagen verdanken wir N. v. Békesy (16). Dieser Autor hat 1939 Versuche angestellt, um zu erfahren, welche Möglichkeit besteht, den Alkaloidgehalt des parasitisch kultivierten Mutterkorns zu beeinflussen.

vierten Mutterkorns zu beeinflussen. Dabei zeigte sich, daß in der Freilandkultur durch Umweltfaktoren (Ernährung, Temperatur, Schädigungen usw.) der Alkaloidgehalt nur in geringem Maße verändert wird. Analysierte N. v. Békesy einzelne Sklerotien aus wildem Mutterkorn ungarischer Herkunft, so zeigten sich bei ihnen erhebliche Unterschiede im Alkaloidgehalt. Die zugehörige Variationskurve (Abb.1) des Alkaloidgehaltes der einzelnen Mutterkörner weist zwei Maxima auf.

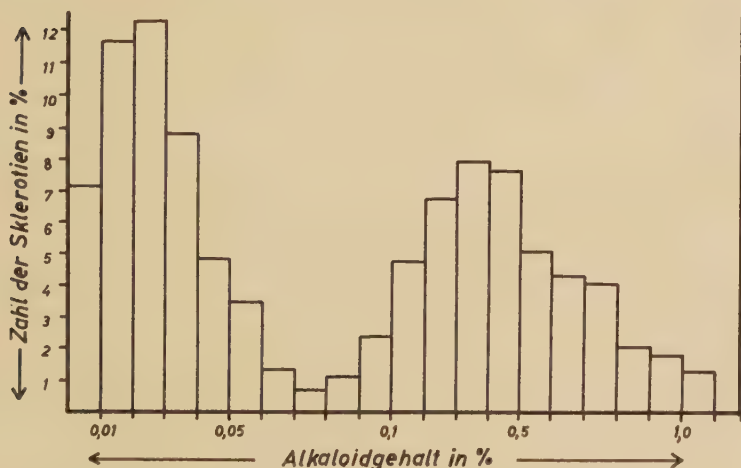


Abb.1 : Die Verteilung des Alkaloidgehaltes in den einzelnen Sklerotien beim ungarischen Mutterkorn.
[nach N. v. Békesy (16)]

Der Autor (17) deutet sie dahingehend, daß in dem untersuchten Mutterkorn ein Gemisch zweier Rassen vorliegt, von denen die eine reich, die andere arm an Alkaloiden ist. In Oberungarn und in Siebenbürgen fand er hauptsächlich die alkaloidarme Rasse verbreitet, wohingegen in anderen Gegenden Ungarns beide Rassen annähernd zu gleichen Teilen vermischt auftreten.

N. v. Békesy untersuchte in ähnlicher Weise Mutterkorndrogen aus Spanien und Portugal, deren Einzelsklerotien bezüglich ihres Alkaloidgehaltes je nach der Drogensorte eingipflige, undeutlich zweigipflige oder auch ein-

deutig zweigipflige Kurven ergaben. Ähnliche Verhältnisse fanden sich auch bei in Deutschland wildgewachsenem Mutterkorn (9). Aus der Alkaloidbestimmung von 400 Einzelsklerotien, welche F. Sobel (18) durchführte, ergab sich folgende Variationskurve:

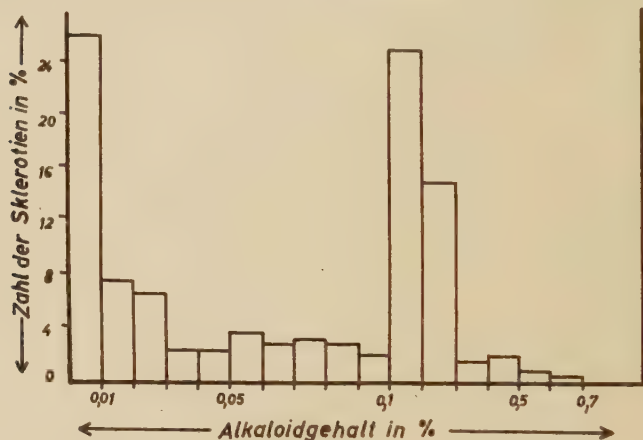


Abb.2 : Alkaloidgehalt einzelner Sklerotien in deutschem Mutterkorn (Sorte R 47).
[nach F. Sobel (18)]

Auch hier treten zwei deutliche Maxima in Erscheinung, welche auf das Vorliegen zweier Rassen hinweisen. Nach weiteren Untersuchungen von N. v. Békésy (19) war eine Probe von Mutterkorn aus Finnland vollkommen frei von Alkaloiden. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen früherer Autoren, welche man so zusammenfassen kann, daß alkaloidarme Rassen in höheren Breitengraden vorherrschen.

Aus diesen Ergebnissen konnte gefolgert werden, daß bereits eine entsprechende Selektion der zur Produktion von Impfstoff verwendeten Mutterkörner zu einer Droge mit hohem Alkaloidgehalt führen würde. Die Erfolge des parasitischen Mutterkornanbaues in vielen Ländern haben ihren Ursprung in dieser Erkenntnis.

Auch eine konstante qualitative Zusammensetzung des

produzierten Wirkstoffgemisches wäre als Rassenmerkmal, wie eingangs bereits erwähnt, von großer Bedeutung für den Anbau. Hierzu enthielt die einschlägige Literatur zu Beginn dieser Arbeit nur wenige Hinweise.

So äußert A. Stoll (20), daß im Handel angetroffenes Mutterkorn unter Umständen sich qualitativ stark unterscheidet und daß die Provenienz der Droge das Vorkommen oder Fehlen einzelner Alkaloide bedingen könne. Weiter berichtet der gleiche Autor (21), daß er 1917/18 im Mutterkorn zentraleuropäischer Herkunft als Hauptalkaloid Ergotamin fand, während in Drogen aus Spanien oder Russland die Alkaloide der Ergotoxingruppe vorherrschten. Im Mutterkorn aus Ungarn und Bulgarien wurden von ihm beide Alkaloide nebeneinander gefunden. Hier haben wir also den ersten Hinweis, daß gewisse Alkaloide oder Alkaloidkombinationen von bestimmten Typen des Pilzes gebildet werden. Gelegentlich der Beschreibung des von ihm entdeckten Ergoclavins berichtet W. Küssner (22) auch über die Ergebnisse der Analysen von Drogen verschiedener Herkunft, welche ebenfalls derartige Unterschiede zeigten.

Droge aus	Ergo- tinin	Ergo- toxin- phosphat	Ergo- clavin	Ergo- taminin	Phosphat von untypischer Kristallform
1. Spanien	37,6 %	11,5 %	19,3 %	.	
2.	31,2 %	15,5 %	18,5 %		
3.	29,0 %	18,7 %	15,8 %		
Russland	45,5 %	10,0 %	19,9 %		
Ungarn	9,0 %	11,0 %	6,2 %	7,2 %	18,5 %

Tab.1 : Analysenergebnisse von Drogen verschiedener Herkunft.
[nach W. Küssner (22)]

Ferner wird durch H. Rochelmeyer (9) die Möglichkeit erörtert, die Alkaloidproduktion im Mutterkorn sowohl in qualitativer als auch quantitativer Hinsicht durch züchterische Maßnahmen zu lenken. Schließlich sei die Arbeit von K. Konrad (23) erwähnt, welche auf Grund ihrer Untersuchungen ebenfalls die Auffassung vertritt, daß die Alkaloidproduktion bei *Claviceps purpurea* sowohl quantitativ als auch qualitativ erbgebunden sei, also ein Rassenmerkmal darstelle.

Hier sei auf eine Arbeit von N. Pfennig (24) hingewiesen, die interessante Parallelen zum Mutterkornproblem zu ziehen gestattet. Er untersuchte Actinomycin bildende Strahlenpilzstämme und die von ihnen produzierten Actinomycine. Bei seinen Ergebnissen erscheint von Bedeutung, daß die Wirkstoffe, erzeugt von bestimmten Einsporkulturen, zum Teil die gleiche Zusammensetzung zeigten wie die der Mischkulturen, von denen er ausging. Andere Einsporkulturen jedoch erwiesen sich als Bildner anderer Actinomycine. Auch höhere Produktionswerte wurden beobachtet.

Auf Grund dieser Beobachtungen in der Literatur hatte unser Arbeitskreis von der Hypothese ausgehend, daß die Alkaloidproduktion bei *Claviceps purpurea* quantitativ und qualitativ erbgebunden sei, im Jahre 1948 die Aufgabe übernommen, für die Herstellung eines Trockenextraktes einen geeigneten Pilzstamm heranzuzüchten. Aus den verschiedensten Gründen kam hierfür eine Wilddroge in Betracht, welche auf aus den U.S.A. stammendem Roggen vorgefunden wurde. Diese Sorte wurde hier zunächst als US 47 bezeichnet und ist bereits früher (9) durch ein Variationspolygon gekennzeichnet worden. (Abb.3). Dazu wurden viele Hunderte von einzelnen Sklerotien auf ihren quantitativen Alkaloidgehalt untersucht. Hierfür wurde jeweils die eine Hälfte eines Sklerotiums zur analytischen Bestimmung verwandt, während die andere Hälfte zurückbehalten wurde, um daraus die Kulturen anlegen zu können.

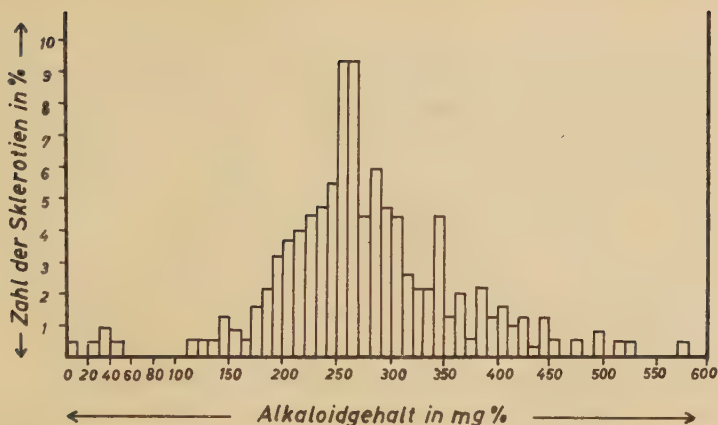


Abb.3 : Alkaloidgehalt einzelner Sklerotien in amerikanischem Mutterkorn (Sorte US 47).
[nach H. Rochelmeyer (9)]

Zur analytischen Bestimmung wurde im Jahre 1948 die Aceton-Äther-Methode (25) verwandt, während in den fortlaufenden Jahren die Weinsäuremethode (25) vorgezogen wurde. Die Auswahl derjenigen Sklerotien, welche für den Feldanbau angelegt werden sollten, wurde im wesentlichen nach dem höchsten Alkaloidgehalt getroffen; es sei allerdings betont, daß auch noch einige andere Eigenschaften der aus diesen Sklerotien hervorgegangenen Mycelien als bedeutungsvoll angesehen wurden. Auf diese Weise erhielt man praktisch nach etwa dreijähriger Selektion eine Droge im Feldanbau, welche auf gleiche Art weiter ausgewertet, im Alkaloidgehalt kaum mehr Steigerungen aufwies. Ein Blick auf die anliegende Tabelle zeigt dieses deutlich.

Alkaloidgehalt als						
Type	Wild- droge	Anbaudroge				
	1948	1949	1950	1951	1952	1953
B	0,495 %	0,431 %	0,619 %	0,730 %	0,758 %	0,793 %

Tab.2 : Steigerung des Alkaloidgehaltes durch Selektion.

Eine gewisse Bestätigung konnte darin erblickt werden, daß in einem zu gleicher Zeit unternommenen Parallelversuch aus einer anderen Wildsorte R 47, welche im Variationspolygon ein deutlich zweigipfliges Maximum aufwies (siehe S.12), ein Versuch ähnlicher Art unternommen wurde. Von dieser Droge wurde einmal nach dem gleichen Verfahren wiederum die Rasse mit dem hohen Alkaloidgehalt herausselektioniert, aber gleichzeitig auch jene Variante ausgelesen, welche frei von Alkaloiden war. Letztere ergab ebenfalls nach dreijähriger Selektionierung eine Sorte im Feldanbau, welche in jedem Sklerotium frei von Alkaloiden war. Hier war also bei einer Type mit negativem Kennzeichen ebenfalls ein Hinweis dafür gegeben, daß eine selektionierende Züchtung nach gleicher Art über drei Vegetationsperioden auf diesem Wege den Endeffekt erreicht. Inzwischen hatte Fräulein Dr. Heymer aus unserer Biologischen Abteilung eine recht einfache Technik entwickelt, um mit Hilfe des binokularen Stereomikroskops Einsporenkulturen, also Klone, anzulegen. Mit Hilfe dieser war es nun möglich, aus Mycelien, welche aus Sklerotien mit hohem Alkaloidgehalt hervorgegangen waren, Klone zu züchten. Die aus ihnen wiederum erzeugten Sklerotien zeigten im quantitativen Alkaloidgehalt zwar eine verhältnismäßig geringe Abweichung vom ursprünglichen Einzelmutterkorn, ergaben aber einen bedeutend höheren Durchschnittswert als die Ausgangsdroge. So wurden aus der im Jahre 1952 erzeugten Anbaudroge der Type B mit einem Durchschnittsgehalt von 758 mg% 300 Einzelsklerotien größeren Gewichtes nach der Weinsäuremethode analysiert. Die von der Untersuchung der Nr. 226 (Alkaloidgehalt 1,42 %) zurückgebliebene Hälfte wurde zur Bildung eines Mycels verwandt. Aus diesem wurden zahlreiche Klone angelegt und deren Sporen zur Belegung von Roggenpflanzen im Gewächshaus verwandt. Der Alkaloidgehalt von 1 %, welcher sich auch im Feldanbau der Klone etwa als Durchschnittswert für die anfallende Droge ergab, bedeutete eine erneute Steigerung gegenüber der Ausgangsdroge (758 mg%) von wesentlichem

Ausmaß. Die Population der Wilddroge ergibt also durch die Auslese nach gehaltvollen Mutterkörnern eine nur unvollkommene Selektionierung, da jedes Sklerotium rassisch aus vielen Einzeltypen zusammengesetzt sein kann. Daß die Klone eine einheitlichere Droge ergeben, geht aus ihrem Variationspolygon hervor. So wurde von einem Klon X, welcher in größerem Umfang im Feldanbau stand und dort einen Durchschnittswert von 950 mg% für die Droge brachte, eine solche Kurve auf Grund der Analysen von 200 Einzelsklerotien angelegt.

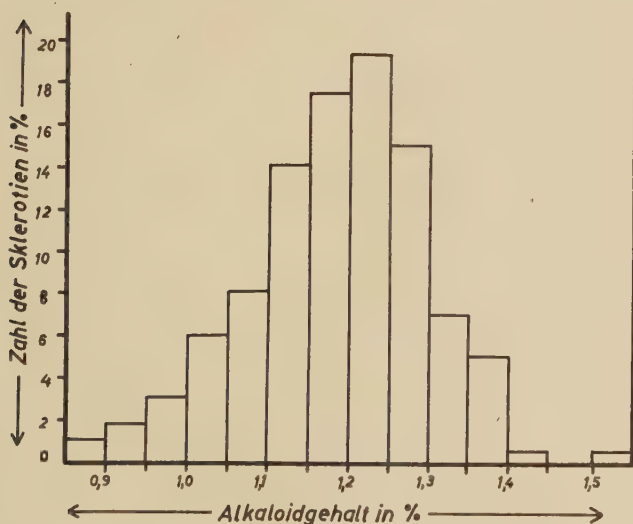


Abb.4 : Alkaloidgehalt einzelner Sklerotien in Klon X.

Zum Vergleich ist darunter das Polygon der ursprünglichen Ausgangsdroge B (758 mg%) wiedergegeben. (Abb.5). Man sieht deutlich, daß die Abweicher bei der Klondroge enger um den Mittelwert gruppiert sind und maximal unter 30 % Abweichung von diesem bleiben. Bei der Droge B erreichen die abweichenden Grenzwerte 50 bis über 60 % Differenz vom Mittelwert.

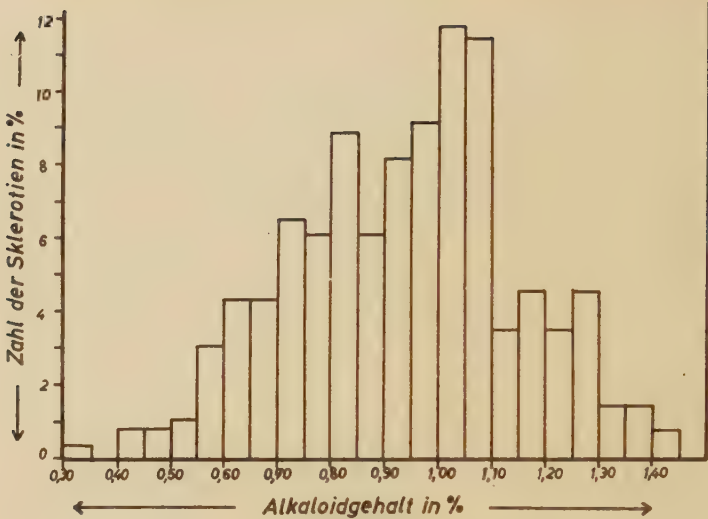


Abb.5 : Alkaloidgehalt einzelner Sklerotien in Stamm B.

Die bisher beobachteten Isolierungen zeigen gruppenweise um das jeweilige Ausgangssklerotium ein relativ einheitliches Bild in Bezug auf den Alkaloidgehalt. Diese Tatsache steht im Einklang mit der Annahme der Monöcie für *Claviceps*, was so zu erklären ist, daß durch die Kombination von weiblichen und männlichen Geschlechtsorganen in einem einzigen Pilzthallus sehr rasch eine genetische Konstanz erreicht wird. Das morphologische Bild von Klonen eines Sklerotiums in saprophytischer, flüssiger Kultur ist nicht ganz so einheitlich, was aber offenbar mit der für den Pilz nicht natürlichen Lebensweise zusammenhängt. Dadurch wird leicht eine genetische Inkonzanz oder Aufspaltung vorgetäuscht. Jedenfalls ist die Zahl der auf einem Mutterkorn vereinigten Individuen der einfach selektierten Typen mit verschiedener genetischer Struktur gering. So wurden bei 26 Einspor-Kulturen auf flüssigen Nährböden von einem Sklerotium der B-Droge zwei verschiedene Typen in fast gleicher Zahl gefunden. Eine andere Gruppe von 12 Isolierungen eines Sklerotiums der B-Droge zeigte 11 identische Typen und einen Abweicher. Die vorliegenden geringen Schwankungen fallen in den Bereich der

normalen Variationsbreite, die durch veränderte Umweltverhältnisse bedingt wird. Es ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß auf dieser Selektionsstufe für das alkaloidbildende Chromosom bereits ein homozygoter Erbgang vorliegt. Ob in diesen Beziehungen zwischen den einzelnen Alkaloidtypen und ihrer mengenmäßigen Bildung bestehen, ist noch völlig unbekannt.

Auch bei der von unserem Arbeitskreis für die Züchtungsversuche herangezogenen Wilddroge US 47 war natürlich die qualitative Zusammensetzung des Wirkstoffgemisches von erstrangiger Bedeutung. Die in der Wilddroge enthaltenen Alkaloide Ergocristin, Ergotamin und Ergometrin waren zum mindesten präparativ die einzigen, die mit Sicherheit nachgewiesen werden konnten. Im Laufe der vorgenommenen Selektionierung, wie sie in den voranstehenden Ausführungen beschrieben wurde, hat sich an dieser Zusammensetzung prinzipiell nichts geändert. Auch in dem zuletzt besprochenen Klon beispielsweise kommen diese drei Wirkstoffe nebeneinander vor. Aus den präparativen Aufarbeitungen der jeweiligen Drogenaufkommen aus dem Feldanbau geht weiter hervor, daß quantitative Verschiebungen dieser drei Wirkstoffe nicht konstatiert werden konnten. Etwa 95 % der gesamten Alkaloide liegen in Form der wasserunlöslichen Vertreter Ergocristin und Ergotamin vor, während rund 5 Gewichtsprozent als Ergometrin angenommen werden können. Das Verhältnis von Ergocristin zu Ergotamin war ebenfalls immer konstant. Danach scheint es also so zu sein, daß die durch das alkaloidbildende Chromosom ausgelöste Bildung der drei Wirkstoffe auch ihre Quantität determiniert.

Im Rahmen weiterer züchterischer Arbeiten sollten nun Versuche unternommen werden, durch physikalische oder chemische Methoden eine dauerhafte Veränderung des Faktors für Alkaloidbildung hervorzurufen. Eine solche Beeinflussung könnte sich in einer Verminderung der Wirkstoffe manifestieren, was durch die Kontrolle mit der Weinsäure-

methode leicht zu erfassen wäre. Es wäre aber auch denkbar, daß sich die qualitative Zusammensetzung des Alkaloidgemisches änderte. Sei es, daß diese Veränderungen nur quantitativer Natur wären, oder sei es gar, daß das eine oder andere Alkaloid ausfallen würde. Für den letzten Fall wäre eine qualitative Analysenmethode unerläßliche Voraussetzung für die Durchführung solcher Versuche. Eine solche zu schaffen, war Aufgabe vorliegender Arbeit.

Die Beeinflussung des Erbgutes einer pflanzlichen Zelle erfolgt am zweckmäßigsten entweder in der generativen Phase zur Zeit der Reduktionsteilung, wo bekanntlich der Chromosomensatz gegen äußere Einflüsse besonders empfindlich ist. Es kann auch in der vegetativen Phase junges Gewebe durch physikalische oder chemische Agentien beeinflusst werden. Die gleichen Verhältnisse gelten natürlich auch für unseren Pilz. Die aus dieser Beeinflussung zu erhoffenden Veränderungen können allerdings nur nach der Bildung des Sklerotiums beobachtet werden, denn bekanntlich setzt hierbei die Bildung der Alkaloide ein. Das bedeutet also praktisch gesehen, daß sowohl Ascosporen oder Konidiosporen, oder aus diesen hervorgegangene Mycelien durch die oben erwähnten Agentien beeinflusst werden müssen, und daß diese Gewebe oder ihre Sporen auf die Wirtspflanze Roggen gebracht werden müssen, um den Effekt an der Alkaloidbildung im Sklerotium zu studieren. Naturgemäß ist für solche Züchtungen nur das Gewächshaus geeignet. Es gestattet einmal die Erzeugung von mehreren Generationen nacheinander in einer Vegetationsperiode und können Fremdinfectionen verhältnismäßig gut ausgeschlossen werden. Die hiermit gegebene Raumbeschränkung bedingt andererseits natürlich einen relativ kleinen Mutterkorn-ertrag. Er wird unter Umständen für je eine Sorte nur wenige Sklerotien betragen. Damit ist eine wesentliche Bedingung gegeben, die für die Schaffung einer qualitativen Analysenmethode richtungsweisend ist. Die Analytik muß die qualitative Trennung der Alkaloide bis zur Größenordnung

von Bruchteilen eines Milligramms ermöglichen. Da die vorliegende in Frage kommende Type etwa 1 % an Alkaloiden enthält und man im allgemeinen von einem Durchschnittsgewicht eines Sklerotiums bei Einzelinfektion von 100 bis 200 mg ausgehen darf, so wären die zu untersuchenden Alkaloide hierbei in der Größenordnung etwa von 1 Milligramm liegend. Da bei einer Infektion einzelner Roggenpflanzen im Gewächshaus Fehlbelegungen eigentlich nicht zu beobachten sind, und jeweils mehrere Sklerotien je Ähre produziert werden, so könnten diese Mengen von 100 bis 200 mg Droge als untere Grenze für unsere Versuche angesehen werden. Für die analytische Bearbeitung heißt das also, daß im ungünstigsten Falle 1 mg = 1000 δ Alkaloidgemisch zur Identifizierung vorliegen. Diese setzen sich bei dem Klon X etwa folgendermaßen zusammen: Auf 720 δ Ergocristin kommen 240 δ Ergotamin, während nur 40 δ Ergometrin vorhanden sind. Eine solche Mischung von Alkaloiden gilt es also zunächst qualitativ zu trennen. Es ist weiter zu bedenken, daß bei der Einwirkung äußerer Faktoren auf das Erbgut einer pflanzlichen Zelle der Erfolg nur selten manifest ist. Auch der massierte Einsatz irgendwelcher Agentien bringt nur relativ kleine Erhöhungen der Mutationsrate mit sich. Das bedeutet, daß, um solche Auswirkungen zu beobachten, ein ziemlich umfangreiches Material in den Züchtungsversuch einzubeziehen ist. Für die qualitative Analyse heißt das, daß die Methodik so beschaffen sein muß, daß ganze Reihen gezüchteter Sklerotien schnell untersucht werden können.

Bei der Suche nach einer geeigneten Methode, um derartig kleine Mengen von Mutterkornalkaloiden qualitativ voneinander zu trennen, war es naheliegend, zunächst an die Papierchromatographie zu denken. G.E. Foster, J. MacDonald und T.S.G. Jones (26) hatten sie bereits auf Mutterkornalkaloidgemische angewandt und dabei auch insofern einen Erfolg erzielt, als es relativ gut möglich war, Ergometrin und Ergometrinin von den wasserunlöslichen

Alkaloiden abzutrennen. Sie konnten sogar dieses Verfahren dazu benutzen, den Anteil an wasserlöslichen Basen quantitativ zu schätzen. Auch eine Trennung der wasserunlöslichen Alkaloide haben sie versucht. Dazu hydrolysierten sie die Wirkstoffe des Mutterkorns, um die dabei als Spaltprodukte auftretenden Aminosäuren papierchromatographisch zu ermitteln. Da aus diesem Gemisch naturgemäß die korrespondierenden Vertreter der Ergotoxingruppe und der Ergotamingruppe nicht unterschieden werden können, hat diese Methodik nur beschränkten Wert. Dazu kommt, daß zur Hydrolyse der Alkaloide eine mehrstündige Verseifung erforderlich ist, welche Reihenuntersuchungen hindernd im Wege steht. Interessanter ist schon die Arbeit von H. Brindle und Mitarbeitern (27), welchen es gelang, auf gepuffertem Filtrierpapier die Alkaloide der Ergotoxingruppe von denen der Ergotamingruppe zu trennen. Diese Methodik wurde auch später von L. Fuchs und M. Pöhm (28) angewandt, um nach der Trennung auf papierchromatographischem Wege die Alkaloide der Ergotoxingruppe getrennt von denen der Ergotamingruppe zu hydrolysieren und dann die Aminosäuren in bekannter Weise nachzuweisen. Beim Nacharbeiten der Methodik von H. Brindle hatte ich nicht den gewünschten Erfolg. Sollte es aber möglich sein, eine derartige Trennung der beiden wasserunlöslichen Gruppen vorzunehmen, so würde trotzdem eine solche Methodik nicht in Frage kommen, da die Arbeitsweise zu umständlich und zeitraubend für Reihenuntersuchungen ist. Einen anderen Weg beschritt K. Konrad (23). Ausgehend von etwa 20 g Droge stellte sie durch Perkolation des alkalisch gemachten Drogenpulvers mit Chloroform einen Auszug her, den sie chromatographisch vorreinigte. Durch Eindampfen erhielt sie einen Extrakt, den sie in zwei Hälften teilte; die eine wurde durch entsprechende Behandlung mit Methanol in die rechtsdrehenden Isomeren der Alkaloide umgewandelt. Diese beiden Extrakte wurden erneut getrennt chromatographiert und die ablaufenden Eluate auf einem Objektträger

ger nach der Arbeitsweise, wie sie A. Kofler (29) angegeben hat, zur Kristallisation gebracht. Kristallform und Schmelz- bzw. Zersetzungspunkte dienten dann zur Identifizierung der betreffenden Alkaloide. Die wasserlöslichen Alkaloide wurden dabei papierchromatographisch bestimmt.

An dieser Arbeit erschien mir interessant, daß es möglich war, die Mutterkornalkaloide auf einem Objektträger in typischer Form zur Kristallisation zu bringen und sie damit zu erkennen. Ich untersuchte deshalb die für mich hauptsächlich in Frage kommenden wasserunlöslichen Vertreter aus dem Klon X, nämlich Ergotamin und Ergocristin und ihre rechtsdrehenden Isomeren. Dabei stellte ich fest, daß sich diese Alkaloide in geeigneten Lösungsmitteln sehr gut auf dem Objektträger zur Kristallisation bringen lassen. Ihre Erkennung bereitet kaum Schwierigkeiten. Auch die Mengen, die hierfür nötig sind, sind bemerkenswert gering. So liegen sie für Ergocristin bei etwa 20 μ g und für Ergotaminin bei etwa 10 μ g. Nachdem ferner sowohl aus der K. Konrad'schen Arbeit (23) wie auch aus einigen Untersuchungen vorher (30,31) bekannt war, daß gewisse Mutterkornalkaloide sich durch Chromatographie an Aluminiumoxyd reinigen bzw. trennen lassen, wurde auch im vorliegenden Fall versucht, die Alkaloide aus Extrakten nach Chromatographie an Aluminiumoxyd auf dem Objektträger zur Kristallisation zu bringen. Die angestellten Versuche ergaben, daß auch hierbei die schon für Reinalkaloide gültigen Mengen an Alkaloid ausreichen, um im Kristallisationsbild nachgewiesen werden zu können. Anschließend versuchte ich durch künstlich hergestellte Mischungen solcher Alkaloide ihre Trennungsmöglichkeit im chromatographischen Verfahren an Aluminiumoxyd zu überprüfen.

Es galt zunächst, das für die Mikrokristallisation eines jeden der vier Alkaloide günstigste Kristallisationslösungsmittel zu finden. Beim Durchprobieren einer großen

Zahl von Lösungsmitteln erwiesen sich die in Tabelle 3 zusammengestellten als vorteilhaft für eine typische Mikrokristallisation.

Tab.3 :

Alkaloid	Lösungs= mittel	Kristallform	Schmelz= punkt (Zers.)
Ergocristinin	Äthanol 90 %	bootförmige Prismen und Nadeln;	226°
	Aceton 90 %	dicke zugespitzte Prismen.	226°
Ergocristin	Äthanol 90 % + 1% H_3PO_4	Rauten, die sich nach längerem Stehen in Sechsecke umwandeln. (Rosetten)	185°
Ergotaminin	Methanol und Äthanol 90 %	verschiedene Kristallformen: Dreiecke, Trapeze, Fünfecke.	242-45°
Ergotamin	Aceton 90 %	Platten.	180-81°

Um Vergleichsmöglichkeiten bezüglich der Kristallformen der einzelnen Mutterkornalkaloide in verschiedenen Lösungsmitteln zu erhalten, legte ich eine Sammlung von Kristallaufnahmen aller bekannten Mutterkornalkaloide an.

Zur chromatographischen Trennung der Reinalkaloide wurden 1 %ige Verreibungen von Ergocristin, Ergocristinin, Ergotamin (als Ergotamin-Aceton-Wasser-Kristallisat) und Ergotaminin mit Milchzucker verwandt. Diese Milchzucker=verreibungen wurden mit Methylenchlorid digeriert und mit dem Lösungsmittel zusammen auf Aluminiumoxydsäulen aufgebracht. Mit Methylenchlorid unter Zusatz von 1 % Äthanol wurde eluiert. Hierdurch wurde erreicht, daß die Alkaloide nicht so stark vom Aluminiumoxyd adsorbiert wurden und

somit die einzelnen Fraktionen konzentrierter an Alkaloid wurden. Die Zone der langsam wandernden Alkaloide konnte im UV-Licht beobachtet werden. Sobald das Eluat Alkaloid enthielt, wurden 4 bis 6 Fraktionen zu je 1 ml in kleinen Reagensgläsern aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden auf einem Objektträger zur Trockne gedunstet und zur Kristallisation gebracht. Nach dem Auflegen des Deckgläschens auf den amorphen Rückstand wurde das Lösungsmittel mit einer Pipette seitlich zugegeben. Durch leichtes Verschieben des Deckglases wurde die Kristallisation beschleunigt. Wie im experimentellen Teil dieser Arbeit an einem Beispiel gezeigt wird, können demnach die vier Alkaloide adsorptionschromatographisch getrennt und in der Reihenfolge Ergocristinin, Ergocristin, Ergotaminin und Ergotamin im Eluat aufgefangen und unter dem Mikroskop erkannt werden. Nachdem das Lösungsmittel aus den Präparaten abgedunstet war, konnten die Kristalle mit Hilfe der Kofler-Mikroschmelzpunktapparatur sogleich auf ihren Schmelz- bzw. Zersetzungspunkt geprüft werden.

Um die Gefahr auszuschließen, daß bei ungünstigen Mischungsverhältnissen der Alkaloide ein Partner übersehen werden könnte, wurden auch extreme Mischungen hergestellt, in welchen der eine Alkaloidpartner in überwiegendem Maße vorhanden war. Die hier durchgeführten Versuche hatten ebenfalls ein günstiges Ergebnis.

Selbst bei den Mischungen, bei denen jeweils eine Alkaloidkomponente das Hundertfache der anderen betrug, konnten die Alkaloidgemische chromatographisch in ihre Bestandteile zerlegt werden. Eine Trennung der Alkaloide in abgeteilte Zonen konnte im UV-Licht an der Säule bei der angewandten Technik nicht beobachtet werden. Das heißt also, daß die einzelnen Alkaloide unmittelbar aufeinander folgen. Der mengenmäßig überwiegende Alkaloidpartner erschien dabei jeweils auf mehrere Fraktionen verteilt. Die rechtsdrehenden Alkaloide waren etwas leichter zur Kristallisation zu bringen, insbesondere, weil die Kristallformen

des Ergocristinins und des Ergotaminins sich auf dem gleichen Objektträger nebeneinander zu bilden vermögen, was bei Ergocristin und Ergotamin nur schlecht erreicht wird.

Übertrag ich die so gemachten Erfahrungen auf Extrakte, welche nach der Methodik von K. Konrad gewonnen waren, so war es gar nicht schwierig, die in diesen enthaltenen wasserunlöslichen Alkaloide z.B. des Klon X in der angegebenen Weise aufzutrennen. Arbeitete man dabei anstatt mit Chloroform mit Methylenchlorid, so waren die erhaltenen Extrakte noch etwas besser kristallisierbar. Die gesamte Methodik der Herstellung dieser Extrakte hat jedoch den großen Nachteil, daß sie erhebliche Zeit in Anspruch nimmt. Läßt man beispielsweise, um Zeit zu sparen, die erste Chromatographie als Vorreinigung weg, so ist der erhaltene Extrakt weil fetthaltig schwerer zu kristallisieren. Es ist deshalb angebracht, das Fett aus einem solchen Extrakt zu entfernen. Da eine Entfettung der Droge quantitativ kaum möglich ist, kann also auf die chromatographische Vorreinigung nicht verzichtet werden. Nimmt man alkoholische Flüssigkeiten zur Extraktion der Droge, so sind die so bereiteten Extrakte bei der chromatographischen Adsorption schwer trennbar. Vielleicht kann diese Erscheinung auf die Bildung von Additionsverbindungen zwischen Alkohol und Alkaloiden zurückgeführt werden. Schließlich fand ich in der 30 %igen wässrigen Weinsäure - wie sie in unserem Institut zur Extraktion für die quantitative Alkaloidbestimmung Verwendung findet - ein geeignetes Extraktionsmittel. Der Drogenauszug, der mit dieser 30 %igen wässrigen Weinsäurelösung bereitet war, ließ sich zur Mikroanalyse sehr gut aufarbeiten. Das fein gemahlene Mutterkorn wird mit der Weinsäurelösung extrahiert; nach der Neutralisation mit festem Natriumkarbonat wird mit Methylenchlorid ausgeschüttelt, die organische Phase abgetrennt und zur Trockne verdampft. Es ist nicht empfehlenswert, dieses so gewonnene Alkaloidgemisch ohne Umlagerung der Adsorptionschromatographie zu unterwerfen,

da es manchmal schwierig ist, das Ergotamin zu erkennen. Offensichtlich wandelt sich bei der Aufarbeitung des Drogenauszuges ein Teil des Ergotamins in Ergotaminin um, welches dann mit dem genuinen Alkaloid zu der Molekülverbindung Sensibamin zusammentritt. Diese zeigt nicht mehr die charakteristische Kristallform des Ergotamins. Dieser Schwierigkeit wird durch die Umlagerung der Alkaloide begegnet. Nach der Umlagerung der Alkaloide in die rechtsdrehenden Formen wird der resultierende Extrakt durch einmalige Chromatographie an Aluminiumoxyd in seine Bestandteile zerlegt. Die alkaloidhaltigen Eluate werden auf einem Objektträger zur Kristallisation gebracht und die Alkaloide auf Grund ihrer Kristallformen und ihres Verhaltens während der Feststellung des Mikroschmelzpunktes identifiziert. Die wasserlöslichen Alkaloide werden papierchromatographisch getrennt bestimmt. Hierzu wird aus einem Teil der Methylenchloridlösung ein Rundfilter-Papierchromatogramm angefertigt, welches bei Anwesenheit von Ergometrin einen schön hellblau fluoreszierenden Ring mit dem R_F -Wert 0,71 bis 0,73 zeigt. Bei der angewendeten Arbeitsweise ist kein Ergometrinin, auch keine Umwandlung von Ergometrin in Ergometrinin, das den R_F -Wert 0,80 bis 0,82 zeigt, beobachtet worden.

Die so erarbeitete Methode wurde nun zunächst dazu benutzt, aus Klonen der Droge B hervorgegangene Sklerotien auf die qualitative Zusammensetzung des produzierten Alkaloidgemisches zu untersuchen. So wurde, wie bereits erwähnt, aus der Droge B des Jahres 1953 ein Mutterkorn ausgewählt, dessen quantitative analytische Bestimmung in einer Hälfte einen Alkaloidgehalt von 1,42 % ergab. Die andere Hälfte wurde zur Anlage einer Pilzkultur auf saprophytischem Nährboden benutzt. Von dieser Pilzkultur wurden nach der bei uns üblichen Technik Klone angelegt. Sämtliche 55 angelegten Klone aus dieser Kultur wurden im Gewächshaus zur Sklerotienbildung gebracht. Alle Sklerotien, welche aus diesen Klonen hervorgingen, wurden auf ihren

Alkaloidgehalt in qualitativer Hinsicht untersucht. In keinem Fall war irgendeine andere Alkaloidzusammensetzung zu beobachten. Alle Sklerotien aus den 55 Klonen enthielten sowohl Ergocristin, Ergotamin als auch Ergometrin. Damit war ein weiterer Beweis dafür geliefert, daß die vorgenommene einfache Selektionierung nach dem Höchstgehalt an Alkaloiden schon ein weitgehend homozygoten Gebilde in Bezug auf diese Eigenschaft ergeben hatte.

Weiter wurde eine große Anzahl der gleichen Geschwisterklone durch Chemikalien wie Chloralhydrat, Trypaflavin, Colchicin, Sublimat, Urethan, Cibazol, Äthylalkohol, Jodkali, Chinon, Dioxan u.a.m. behandelt. Auch ultraviolettes Licht, Röntgenstrahlen und Kälteschocks wurden versucht, um das Erbgut dieser Klone zu beeinflussen. Die aus den behandelten Mycelien hervorgegangenen Sklerotien wurden dann wiederum nach obiger Methode auf die qualitative Zusammensetzung des enthaltenen Alkaloidgemisches geprüft. In keinem Fall konnte hier eine wesentliche Veränderung der Wirkstoffe in ihrer qualitativen Zusammensetzung beobachtet werden. Es muß dabei betont werden, daß die Mycelien in vielfacher Variation mit den genannten Agentien in Berührung gebracht wurden. Das sich dann entwickelnde Pilzgewebe zeigte eindeutig morphologisch und anatomisch sichtbare Veränderungen, welche auf einen aktiven Einfluß dieser Agentien zurückzuführen waren. Jedoch scheint der Faktor für die Alkaloidbildung resistent zu sein.

Außer diesen Versuchen wurden mit gleicher Methode dann weiter noch kleine Mengen von Gras-Mutterkorn untersucht, welche ich im Laufe des Sommers 1952 gesammelt hatte. Wenn auch diesen qualitativen Untersuchungen nur eine beschränkte Bedeutsamkeit zugemessen werden kann, weil die Populationen, welche auf den Gräsern angenommen werden müssen, damit auch im Alkaloidbild eine Mischung ergeben, die nicht sehr charakteristisch ist, so sind doch die Befunde von einiger Bedeutung. Zunächst konnte ich die Beobachtungen von K. Konrad (23) an einigen Gräsern be-

stätigen. Weiterhin wurden noch neue Wirtspflanzen von mir herangezogen.

Wirtspflanze	Alkaloid= gehalt des Mutterkorns	Alkaloid-Gruppe		
		Ergo- toxin	Ergo- tamin	Ergo- metrin
Holcus	614 mg%	+++	---	+
Alopecurus	551 mg%	+++	+++	(+)
Festuca	600 mg%	+++	---	+
Lolium	445 mg%	+++	+++	+++
Molinia	1190 mg%	+++	+++	---
Phalaris	600 mg%	+++	---	+++
Phragmites	658 mg%	+++	+++	+++

Tab.4 : Alkaloidgruppenbestimmung
in Gras-Mutterkorn.

Dabei ist z.B. als auffällige Tatsache zu bemerken, daß das Mutterkorn, welches auf Molinia wächst, einen so hohen Alkaloidgehalt hat und wie zu erwarten die Vertreter der Ergotoxingruppe neben denen der Ergotamingruppe nebeneinander aufweist. Interessant ist aber, daß Ergometrin in der gleichen Droge nicht vorkommt oder - wie K. Konrad angibt - nur in Spuren dort anzutreffen ist. Im allgemeinen enthalten Mutterkornrassen, welche beispielsweise auf Roggen vorkommen und einen hohen Wirkstoffgehalt aufweisen, vielfach Alkaloide der Ergotoxingruppe und solche der Ergotamingruppe. Allerdings sind sie dann auch meist durch einen hohen Ergometringehalt gekennzeichnet. Eine solche Sorte, wie wir sie auf Molinia finden, ist auf Getreide keineswegs häufig. Andererseits wiederum ist die gleiche Rasse *Claviceps microcephala* auf *Phalaris arundinacea* vorkommend und *Phragmites communis* befallend, als stark ergometrinhaltig gefunden worden, während auf *Phalaris* kein Ergotamin gefunden wurde. Vielleicht sind aus diesen Beobachtungen doch noch interessante Schlüsse zu ziehen.

Die geschaffene Mikromethode zur Trennung von Ergocristin, Ergotamin und Ergometrin bzw. deren rechtsdrehenden Isomeren hatte mit diesen Versuchen ihre Brauchbarkeit zur Beurteilung züchterischer Ergebnisse völlig erwiesen. Sie war auch mit gewissen Einschränkungen vom biologischen Sektor her herangezogen worden zur qualitativen Beurteilung des Alkaloidgemisches in Gras-Mutterkörnern. Es sollte nun versucht werden, sie auf größere Alkaloidmengen zu übertragen. Damit wäre einmal möglich, durch Aufarbeitung größerer Drogenmengen die mit der Mikromethode erzielten Ergebnisse zu festigen. Es wäre weiter denkbar, daß auf diese Weise eine quantitative Bestimmung der einzelnen Alkaloide in der Droge möglich wäre, und damit vielleicht auch der Weg zu einer Reindarstellung der Mutterkornalkaloide in präparativem Ausmaß geschaffen wäre. Nach den eingangs beschriebenen Versuchen mit Reinalkaloidgemischen bestand auch die Möglichkeit, eine Auftrennung der Alkaloide in linksdrehende und rechtsdrehende zu versuchen. Die Lösung dieser Aufgabe würde bedeuten, mittels dieser Methode einen Extrakt auf seine Wirksamkeit chemisch untersuchen zu können; eine Möglichkeit, die bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurde.

Es war klar, daß für die Extraktion größerer Drogenmengen die Verwendung von 30 %iger Weinsäure, wie sie in der Mikromethode beschrieben ist, hier nicht in Frage kam. Als brauchbar erwies sich die Möglichkeit, Mutterkorn mit verdünntem, weinsaurem Alkohol zu perkolieren und diese Flüssigkeit direkt nach der Alkalisierung mit Methylenchlorid auszuschütteln. Die Methylenchloridlösung enthielt dann praktisch alle Alkaloide, welche im Perkolat vorher enthalten waren und konnte durch Verjagen des Lösungsmittels auf einfache Weise zu einem verwendbaren Extrakt gebracht werden. Die Aufarbeitung des Mutterkorns zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Alkaloide sei an einem Beispiel von 1 kg Droge im folgenden kurz erläutert.

1 kg Mutterkorn wird im Tiefkühlschrank 24 Stunden lang auf -30° gekühlt. Nach dem Mahlen wird aus einer Probe der Gesamt-Alkaloidgehalt mit Hilfe der Weinsäuremethode bestimmt und als Ergotamin berechnet. Die gemahlene Droge wird mit 3 Litern einer Mischung aus 60 Teilen Methanol, 2 Teilen Weinsäure und 38 Teilen Wasser übergossen und 2 Stunden stehen gelassen. Danach wird die durchfeuchtete Droge in ein Perkulationsrohr gefüllt und darin etwa 8 Stunden belassen. Die anschließende Perkolation wird so geregelt, daß innerhalb von 2 Stunden etwa 1 Liter Perkolat abfließt. Nachdem 6 Liter obiger Perkulationslösung in die Droge eingedrungen sind, wird mit Wasser der Rest des Perkolates herausgedrückt. Im allgemeinen ist mit 6 Litern Perkolat die Droge restlos erschöpft.

Die vereinigten Perkolate werden durch Zugabe von Ammoniak auf ein P_H von etwa 8 gebracht. Den sich dabei bildenden Niederschlag, der hauptsächlich aus Ammonium- und Erdalkalisalzen besteht, aber auch adsorptiv gebundenes Alkaloid in erheblicher Menge enthalten kann, läßt man absitzen. Durch Dekantieren und Filtrieren trennt man den Niederschlag ab. Nach dem Trocknen wird er mit Methylenchlorid ausgerührt, um die Alkaloide herauszulösen. Dieses Methylenchlorid wird später der Ausschüttelung zugefügt.

Das Filtrat wird zweimal mit 20 % Methylenchlorid ausgeschüttelt; nach einer dritten Ausschüttelung mit 10 % Methylacetat ist die methanolisch-wässrige Phase praktisch frei von Alkaloiden und wird verworfen. Die Ausschüttelungen werden vereinigt, im Vakuum unter Durchleiten von Stickstoff auf ein Volumen von etwa 50 ml eingeeengt und darauf im Vakuum-Trockenschrank vollkommen vom Lösungsmittel und von Feuchtigkeit befreit.

Es resultiert ein hellgelber Rückstand, welcher nach der Bestimmung des Blauwertes einen Alkaloidgehalt von etwa 90 %, berechnet als Ergotamin, aufweist. Dieses Alkaloidgemisch wird nun chromatographisch in seine Bestandteile zerlegt.

Hierzu wird es, in Methylenchlorid gelöst, auf eine Aluminiumoxydsäule von entsprechenden Abmessungen gebracht. Mit dem gleichen Lösungsmittel wird eluiert. Die Alkaloide ziehen sich entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeit auf der Säule auseinander und erscheinen nacheinander bzw. mit geringfügigen Überlagerungen im Eluat. Die Überwachung erfolgt mit Hilfe des für die einzelnen Alkaloide typischen und bei der Mikroanalyse beschriebenen Kristallbildes. In kurzen Abständen wird ein Tropfen der ablaufenden Alkaloidlösung auf einen Objektträger gebracht und das Alkaloid auf Grund seiner Kristallform identifiziert. Alle Fraktionen, welche das gleiche Kristallbild zeigen, werden vereinigt. Zunächst erscheint das Ergocristinin, welches durch Umlagerung aus dem Ergocristin während der Aufarbeitung entstanden ist. Dann folgt das Ergocristin. Fraktion 2 stellt ein Gemisch aus Ergocristin und Ergotaminin dar. Bald verschwindet Ergocristin aus dem Eluat und das nun herauslaufende Ergotaminin wird mit dem danach folgenden Ergotamin zur Fraktion 3 vereinigt. In Fraktion 4 endlich befindet sich direkt nicht mehr kristallisierendes Alkaloid und der Anteil an Ergometrin. Obwohl dem Ergometrin eine außerordentlich starke Haftfähigkeit an Aluminiumoxyd eigen ist, gelingt es doch durch Einsatz größerer Mengen an Elutionsflüssigkeit, dieses Alkaloid aus der Säule herauszulösen, was durch papierchromatographischen Nachweis aus dem Eluat leicht bewiesen werden kann. Bezüglich der nicht mehr kristallisierbaren wasserunlöslichen Alkaloide sei auf die Arbeit von W. Offenbächer (25) verwiesen, welcher durch mehrmaliges Chromatographieren an Aluminiumoxyd diese fraglichen Alkaloide als eine Mischung von Ergotaminin und Ergotamin identifizierte. Andere wasserunlösliche Alkaloide als Ergotaminin und Ergotamin konnten nicht nachgewiesen werden. Die 4 Eluate enthalten also insgesamt etwa 90 % der auf die Säule aufgebrachten Alkaloide.

Zur quantitativen Bestimmung wird von jeder Fraktion nach Messen ihres Volumens genau 1 ml in ein Reagensglas

pipettiert und im Wasserbad zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird mit 1 ml Eisessig aufgenommen und mit 9 ml 2 %iger Weinsäurelösung vermischt. Nach nochmaliger Verdünnung bis auf etwa 20 bis 100 μ g Alkaloid pro ml wird ein Anteil der Lösung mit dem doppelten Volumen an Reagens nach van Urk versetzt und photometrisch gemessen. Für die photometrischen Messungen diente der Photometer ELKO 11 von Zeiss-Opton. Die Eichkurve wurde mit reinsten Alkaloiden aufgestellt. Durch Multiplikation des abgelesenen Photometerwertes mit dem Grad der Verdünnung und dem Volumen der Fraktion in ml ist der Gehalt der einzelnen Fraktionen an Alkaloid leicht zu errechnen. Die so erhaltenen Analysenwerte stimmten sehr gut mit den gewichtsanalytisch gefundenen der einzelnen Fraktionen überein.

Nach der vorstehend beschriebenen Arbeitsmethode wurden nun größere Mengen verschiedener Drogentypen aufgearbeitet. Hierzu wurden sowohl die Droge B und der Klon X als auch ein nur Ergotamin enthaltendes Muster herangezogen. Anschließend wurde versucht, die Wirkstoffe dieser Drogen aus den erhaltenen Fraktionen in möglichst hoher Ausbeute in reiner Form zu isolieren, um sie als solche zu charakterisieren, als auch durch Herstellen verschiedener Derivate derselben ihre Identität sicherzustellen. Die außerordentliche Unbeständigkeit und Zersetzlichkeit der Mutterkornalkaloide, besonders im analysenreinen Zustand, bringen es mit sich, daß an quantitative Kristallisationen und quantitative Umwandlungen in andere Formen und Verbindungen nicht zu denken ist. Ausbeuten von 60 bis 80 % der Theorie müssen daher als gut bezeichnet werden, und auch sie können erst nach längerer Übung und mehreren Versuchen erzielt werden.

Wie im experimentellen Teil näher ausgeführt wird, wurde der Extrakt der Ergotamin-Droge wegen seines geringeren Alkaloidgehaltes chromatographisch vorgereinigt. An eine Aufteilung in einzelne Fraktionen konnte hier verzichtet werden, da diese Droge an wasserunlöslichen Alkaloiden ja

nur Ergotamin enthielt.

Die Erfahrungen, die beim Verarbeiten größerer Mengen der Droge B und des Klons X gesammelt wurden, erlauben es, eine Aussage über das Verhalten dieser Drogen bei der Aufarbeitung zu machen. Die Klon-Droge ließ sich zur Analyse quantitativer wie auch qualitativer Art, sowie zur Darstellung von Extrakten und von Reinalkaloiden am besten verarbeiten. Außer dem günstigen Alkaloidgehalt schienen auch die Begleitstoffe einheitlich und damit leichter eliminierbar. Die Aufarbeitung der Droge im technischen Maßstab bestätigte diese Erfahrung.

Der Vergleich der isolierten Reinsubstanzen aus den präparativen Versuchen mit den Mikrokristallisationen aus den gleichen Drogen ergab vollkommene Übereinstimmung, so daß die Aussagen über die Anwesenheit von Ergocristin und Ergotamin in einer Droge mit Hilfe der von mir erarbeiteten Mikromethode nunmehr gesichert sind.

Die Übertragung der geschaffenen Mikromethode zur Trennung von Ergocristin, Ergotamin und Ergometrin auf größere Mengen Alkaloidgemisch, etwa in der Größenordnung von 2 g Alkaloid an aufwärts, erlaubt also eine bedeutend weitergehende Aussage. Sie gestattet sowohl die qualitative als auch die quantitative Bestimmung der vorhandenen Mutterkornalkaloide, getrennt nach linksdrehenden und rechtsdrehenden Isomeren. Es erscheint nun weiter interessant, diese qualitativ und quantitativ erweiterte Methode auf einen Extrakt von der Art "Secale concentratum Stada" anzuwenden[†]). Dieser Extrakt enthält ja, ausgehend von einer Droge der Type B, die gleichen Alkaloide. Auch hier konnte die gleiche Methodik, wie bei den vorstehend beschriebenen

[†]) Ich verdanke es dem Entgegenkommen der Firma Excorna, daß mir für die folgenden Versuche eine größere Menge der modernsten Form dieses Extraktes zur Verfügung gestellt wurde.

Drogenbeispielen, angewandt werden. Hierzu ist es nur erforderlich, den zur Einstellung des Extraktes auf einen Alkaloidgehalt von 10 % verwendeten Milchzucker vom Alkaloidgemisch abzutrennen. Dies gelingt auf einfache Weise durch Digerieren des Extraktes mit Methylenchlorid, in welchem sich die gesamten Basen gut lösen. Durch Filtration wird der unlöslich verbliebene Milchzucker von der Methylenchloridlösung getrennt und durch Nachwaschen mit Methylenchlorid vollständig von den Alkaloiden befreit. Auch das Ergometrin findet sich im Methylenchlorid gelöst. Bei der anschließenden Chromatographie der eingeeengten Alkaloidlösung wird die Elution jedoch nicht wie bei der vorstehend beschriebenen Aufarbeitung von Drogenextrakten so weit getrieben, daß das Ergometrin im Eluat erscheint. Es verbleibt also quantitativ auf der Säule. Nach Beendigung der Elution der wasserunlöslichen Alkaloide gab es sich durch eine lebhaft hellblau fluoreszierende Zone auf der Säule zu erkennen. Diese Zone wurde herausgeschnitten, das Ergometrin mit Methanol vom Aluminiumoxyd abgelöst und das Alkaloid durch Anlegen eines Rundfilter-Papierchromatogramms aus dem methanolischen Filtrat identifiziert.

In den ersten Anteilen des Eluats ist wenig Ergocristinin nachzuweisen. Es ist jedoch bereits stets mit Ergocristin vergesellschaftet, so daß es nicht möglich ist, eine nur Ergocristinin-haltige Fraktion abzutrennen. Die im experimentellen Teil mit 1 bezeichnete Fraktion, welche 1,8 % der wasserunlöslichen Alkaloide enthielt, muß daher als etwa zu gleichen Teilen Ergocristinin und Ergocristin enthaltend gewertet werden. Ferner war es nicht möglich, Ergotaminin zu erkennen oder gar eine dieses Alkaloid enthaltende Fraktion abzutrennen.

Die quantitative Ergometrinbestimmung wurde mit Hilfe der Papierchromatographie durchgeführt. Die Extraktlösung wurde hierzu in steigenden Konzentrationen auf Filtrierpapier aufgetropft, und als Vergleichssubstanz eine be-

stimmte Menge Stammlösung, welche 5 γ Ergometrin entsprach, auf das gleiche Papier aufgetragen. Nach Entwicklung des Papierchromatogramms nach der absteigenden Methode wurde im UV-Licht die Farbgleichheit eines Ergometrin-Fleckens des Extraktes mit dem der Vergleichssubstanz ermittelt. Da die Extraktmenge, welche diesen 5 γ Ergometrin entsprechendem Flecken lieferte, bekannt war, konnte daher leicht der Ergometrinanteil im "Secale concentratum Stada" errechnet werden.

Somit ist eine recht einfache Analysenmethodik geschaffen worden, um in einer Droge oder einem Extrakt die vorliegenden Mutterkornalkaloide qualitativ und quantitativ ziemlich exakt zu bestimmen. Von ganz besonderer Bedeutung ist, daß es auch möglich ist, die pharmakologisch wirksamen linksdrehenden Alkaloide wiederum getrennt quantitativ nebeneinander zu bestimmen.

Damit erlaubt diese chemische Untersuchungsmethode einen Extrakt chemisch und damit auch praktisch pharmakologisch auszuwerten. Diese Methode kann auch auf eine Droge ausgedehnt werden, sofern die Bereitung des Extraktes Veränderungen der genuinen Wirkstoffe ausschließt. Doch muß nochmals darauf hingewiesen werden, daß dieses Verfahren nur für die genannte Alkaloidkombination erprobt wurde. Ob und inwieweit es auch auf andere Drogensorten mit gleichen oder anderen Alkaloidkombinationen übertragen werden kann, muß durch weitere Versuche geklärt werden.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Chromatographische Trennung der Alkaloide

Ergotamin, Ergocristin, Ergotaminin, Ergocristinin.

Von den Alkaloiden Ergocristin, Ergocristinin, Ergotamin (als Ergotamin-Aceton-Wasser-Kristallisat) und Ergotaminin wurden jeweils 1 %ige Verreibungen mit Milchzucker hergestellt. Genau gewogene Mengen dieser Milchzucker-Verreibungen wurden derart verrieben, daß folgende Alkaloidgemische vorlagen:

- 1) 30 ♂ Ergocristin + 3000 ♂ Ergotamin
- 2) 30 ♂ Ergotamin + 3000 ♂ Ergocristin
- 3) 30 ♂ Ergocristinin + 3000 ♂ Ergotaminin
- 4) 30 ♂ Ergotaminin + 3000 ♂ Ergocristinin

Jeweils ein solches Gemisch wurde mit 2 ml Methylenchlorid digeriert und auf eine Säule aufgegeben, welche mit 5 g Aluminiumoxyd nach Brockmann in Methylenchlorid beschickt war. Das Adsorbens erreichte in der Höhe 6,5 cm und hatte einen Durchmesser von 1 cm. Es wurde mit 15 ml Methylenchlorid + 1 % Äthanol eluiert. Nach etwa 8 ml Eluat waren die folgenden 6 Fraktionen zu je 1 ml alkaloidhaltig. Die Ergebnisse der Mikrokristallisationen der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Chromatographische Trennung des Gemisches

Ergotamin, Ergotaminin, Ergocristin und Ergocristinin.

Von den vorstehend angegebenen Milchzucker-Verreibungen wurden genau gewogene Mengen derart verrieben, daß folgendes Alkaloidgemisch vorlag:

- 60 ♂ Ergocristin + 60 ♂ Ergocristinin
+ 60 ♂ Ergotamin + 60 ♂ Ergotaminin

Tab.5 :

Nr.	Gemisch	Fraktion	Mikro- kristallisation
1	30g Ergocristin + 3000g Ergotamin	1 2-6	Ergocristin Ergotamin
2	30g Ergotamin + 3000g Ergocristin	1-5 6	Ergocristin Ergotamin
3	30g Ergocristinin + 3000g Ergotaminin	1 2-6	Ergocristinin + Ergotaminin Ergotaminin
4	30g Ergotaminin + 3000g Ergocristinin	1-5 6	Ergocristinin Ergocristinin + Ergotaminin

Dieses Gemisch wurde mit 2 ml Methylenchlorid digeriert und auf eine Säule aufgegeben, welche mit 5 g Aluminiumoxyd nach Brockmann in Methylenchlorid beschickt war. Das Adsorbens erreichte in der Höhe 6,5 cm und hatte einen Durchmesser von 1 cm. Es wurde mit 15 ml Methylenchlorid + 1 % Äthanol eluiert. Nach etwa 8 ml Eluat waren die folgenden 4 Fraktionen zu je 1 ml alkaloidhaltig. Die Ergebnisse der Mikrokristallisationen der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Qualitative Mikroanalyse von Mutterkorn.

(Das hier angeführte Beispiel betrifft die Untersuchung eines Sklerotiums, hervorgegangen aus dem Klon X).

- a) Das Überführen der Alkaloide aus der Droge in Methylenchlorid.

1 Sklerotium im Gewicht von 240 mg wurde mit dem Skalpell fein geschnitzelt und die Spänchen im rauhen Porzellanmörser gepulvert. Das Pulver wurde in einem Becherglas von 20 ml Inhalt mit 12 ml einer 30 %igen wässrigen Wein-

säurelösung übergossen und 1 Stunde lang unter Rühren ausgezogen. Nach der Filtration durch ein Schnellfilter (Schleicher und Schüll Nr. 1117¹/₂, 7,5 cm Durchmesser) wurde der hellrot gefärbte, leicht getrübbte Auszug unter starkem Rühren durch Zugabe von Natriumkarbonat in kleinen Anteilen neutralisiert und auf einen P_H -Wert von etwa 7,5 bis 8 eingestellt, wofür etwa 3 g erforderlich waren. Durch einmaliges kräftiges Ausschütteln mit dem gleichen Volumen Methylenchlorid wurde das Alkaloidgemisch der wässrigen Phase entzogen. Eine hierbei entstandene Emulsion konnte durch Zentrifugieren (5 Minuten bei 3500 U/min) leicht getrennt werden. Die wasserklare Methylenchloridlösung wurde nach der Trennung von der wässrigen Phase im Scheidetrichter mit 2 g gegläutem Natriumsulfat 30 Minuten getrocknet. Durch Filtrieren und Nachwaschen des Natriumsulfates mit 2 ml Methylenchlorid erhielt man die Lösung der Alkaloide in getrocknetem Methylenchlorid. Zur Bestimmung des Ergometrins wurde 1 ml dieser Lösung entnommen und wie unter d) beschrieben, verarbeitet.

Tab.6 :

Fraktion	Kristallisations- Lösungsmittel	Mikrokristallisation
1	90 %iges Äthanol	Ergocristinin in bootförmigen Prismen.
2	90 %iges Äthanol + 3 H_3PO_4	Ergocristin-Phosphat in 6-eckigen Blättchen und Rosetten.
3	90 %iges Aceton	spitze Prismen von Sensibamin. Nach halbstündigem Stehenlassen des Präparates hatten sich dreieckige Prismen von Ergotaminin gebildet.
4	90 %iges Aceton	spitze Prismen von Sensibamin. Nach einstündigem Stehenlassen des Präparates Bildung von dünnen, beidseitig abgeschnittenen Prismen der Ergotamin-Wasser-Verbindung.

b) Umlagerung der Rohalkaloide.

Der Hauptteil der getrockneten Methylenchloridlösung wurde bei gelinder Temperatur auf dem Wasserbad durch Dar= überleiten von Stickstoff vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in 10 ml Methanol gelöst, dem 0,25 % Eis= essig zugesetzt waren. Diese Lösung wurde 30 Minuten am Rückflußkühler unter Durchleiten von Stickstoff erhitzt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgedunstet und der Rückstand noch etwa 2 Stunden unter Vakuum im Exsik= kator belassen.

c) Chromatographische Zerlegung des Alkaloidgemisches und Identifizierung der Alkaloide.

In ein Glasrohr von 30 cm Länge und 1 cm Durchmesser, dessen eines Ende zu einer feinen Spitze ausgezogen war, wurden auf einen Wattepfropf mit Methylenchlorid im Ver= hältnis 2 : 1 5 g Aluminiumoxyd nach Brockmann einge= schlämmt. Nachdem das Lösungsmittel durchgelaufen war, wur= de der Extrakt, gelöst in 2 ml Methylenchlorid, aufgegeben und in die Säule einsickern lassen. Nun wurde mit 15 ml Methylenchlorid + 1 % Äthanol eluiert. (Die Front der wan= dernden wasserunlöslichen Alkaloide ließ sich gut im UV= Licht verfolgen.) Sobald das Eluat Alkaloid enthielt, was nach dem Durchlaufen von 8 ml Elutionsflüssigkeit der Fall war, wurden folgende Fraktionen erhalten:

Tab.7 :

Fraktion	ml	Kristallbild	Papierchromatographische Prüfung auf Ergometrin
1	1	Ergocristinin	negativ
2	1	Ergocristinin + Ergotaminin	negativ
3	1	Ergotaminin	negativ
4	1	Ergotaminin	negativ

Aus den einzelnen Fraktionen wurden mit einer Pipette einige Tropfen entnommen und auf einem Objektträger verdampft. Der Objektträger lag hierbei auf einem elektrisch beheizten Aluminiumblock, der mit 1 cm weiten Bohrlöchern versehen war. Nach Auflegen des Deckgläschens auf den glasigen Rückstand gab man das Lösungsmittel mit einer Pipette seitlich zu und ließ es sich vollkommen unter das Deckglas saugen. Durch Hin- und Herbewegen des Deckglases wurde die Kristallisation eingeleitet und beschleunigt.

Das Ergometrin verblieb quantitativ auf der Säule. Etwa 3 cm unter dem oberen Rand des Aluminiumoxyds war im UV-Licht ein lebhaft hellblau fluoreszierender Ring zu beobachten. Durch Herausstoßen und Zerschneiden der Säule wurde diese blaue Zone isoliert und in einem Bechergläschen mit 2 ml Methanol ausgezogen. Nach Filtration wurde mit 1 Tropfen dieser methanolischen Lösung ein Rundfilter-Papierchromatogramm angefertigt, welches nach der Entwicklung im UV-Licht einen schön hellblau fluoreszierenden Ring mit dem R_F -Wert 0,71 zeigte.

d) Papierchromatographische Prüfung auf Ergometrin.

Der nach a) der Methylenchloridlösung entnommene ml wurde auf dem Wasserbad zur Trockne abgedunstet und der Rückstand wieder in 2 Tropfen Methylenchlorid gelöst. Die schwach hellgelb gefärbte Lösung ließ man in einer 5 cm langen Glaskapillare hochsteigen und trug sie auf die markierte Mitte eines Rundfilters (Schleicher und Schüll Nr. 2043 b, 11 cm Durchmesser) auf. Dieses Rundfilter wurde in bekannter Weise (31) mit Butanol-Eisessig-Wassergemisch im Verhältnis 4 : 1 : 5 4 Stunden in einer Petrischale mit 10 cm Durchmesser entwickelt. Das entwickelte Rundfilter-Papierchromatogramm zeigte unter der UV-Lampe einen schön hellblau fluoreszierenden Ring mit dem R_F -Wert 0,72.

Präparative Aufarbeitung einer Mutterkorntype,
welche Ergocristin, Ergotamin und Ergometrin enthielt.

5 kg dieser Droge wurden im Tiefkühlschrank 24 Stunden lang auf -30° gekühlt. Nach dem Mahlen wurde aus einer Probe mittels der Weinsäuremethode der Alkaloidgehalt bestimmt und als Ergotamin berechnet. Er betrug 0,66 % (= 33 g Ergotamin). Die gemahlene Droge wurde mit 3 Litern einer Mischung aus 60 Teilen Methanol, 2 Teilen Weinsäure und 38 Teilen Wasser übergossen und nach guter Durchmischung 2 Stunden stehen gelassen. Danach wurde die durchfeuchtete Droge in gleichen Portionen in 5 Perkulationsröhren gefüllt und darin etwa 8 Stunden mazeriert. Die Perkulationsröhren waren 100 cm hoch, 7,5 cm weit und mit einem Hahn versehen. Die anschließende Perkulation wurde so geregelt, daß von jeder Röhre innerhalb 2 Stunden 1 Liter Perkolat gewonnen wurde. Nachdem 6 Liter obiger Perkulationslösung in jeden der 5 Drogendochte eingedrungen waren, wurde der Rest des Perkolates mit Wasser herausgedrückt.

Die vereinigten Perkolate wurden durch Zugabe von 450 ml 25 %iger Ammoniaklösung auf ein P_H von etwa 8 gebracht. Den sich dabei bildenden Niederschlag ließ man absitzen und trennte die überstehende Flüssigkeit durch Dekantieren und Filtrieren ab. Nach dem Trocknen wog der Niederschlag 47,5 g. Er wurde mit 475 ml Methylenchlorid 1 Stunde lang unter Rühren ausgezogen. Dieses Methylenchlorid wurde mit zu der folgenden Ausschüttelung benutzt.

Das Filtrat von insgesamt 30 Litern wurde zweimal mit je 6 Litern Methylenchlorid ausgeschüttelt; nach einer dritten Ausschüttelung mit 3 Litern Methylacetat wurden die Ausschüttelungen vereinigt, im Vakuum unter Durchleiten von Stickstoff auf ein Volumen von etwa 50 ml eingengt und darauf im Vakuum-Trockenschrank vollkommen vom Lösungsmittel und von Feuchtigkeit befreit. Der Rückstand wog 24,2 g. Der Alkaloidgehalt wurde mit Hilfe der Weinsäuremethode zu 84 % = 20,3 g Alkaloide (berechnet als

Ergotamin) gefunden. Dieser Rückstand wurde in 40 ml Methylenchlorid gelöst und über 400 g Aluminiumoxyd nach Brockmann chromatographiert. Die Säule war 28 cm hoch und hatte einen Durchmesser von 5 cm. Die Alkaloid enthaltenden Fraktionen sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Tab.8 :

Fraktion	ml	Kristallbild	Blauwert (als Ergotamin)	%
1	260	Ergocristinin + Ergocristin	8,22 g	40,5
2	115	Ergocristin + Ergotaminin	1,07 g	5,3
3	985	Ergotaminin + Ergotamin	5,27 g	26,0
4	3485	direkt nicht kristallisierbare Alkaloide (Ergotamin + Ergometrin)	4,07 g	20,0
Insgesamt:			18,63 g	91,8

Die einzelnen Fraktionen wurden im Vakuum zur Trockne gebracht und wie folgt weiter verarbeitet:

Fraktion 1: Darstellung von Ergocristinphosphat.

8 g Gemisch aus Fraktion 1 wurden in 144 ml 90 %igem Äthanol heiß gelöst und noch heiß mit 8 ml alkoholischer Phosphorsäure (15 % H_3PO_4) versetzt. Nach 10-minütigem Erhitzen am Rückflußkühler wurde die Lösung zur Kristallisation abgekühlt. Beim Stehen über Nacht kristallisierten 5,7 g Ergocristinphosphat in typisch 6-eckigen Blättchen aus. (62 % der Theorie.) Der Schmelzpunkt dieser ersten Kristallisation lag bei 184° (Zersetzung).

Nach mehrstündigem Stehen der Mutterlauge kristallisierten weitere 0,68 g (6 %) mit einem Schmelzpunkt von 185° (Zersetzung).

Die Mutterlauge, auf 80 ml eingeengt, ergab nach 12-stündigem Stehen 1,96 g des Salzes (17 %) mit dem Schmelzpunkt 187° (Zersetzung).

Ein viertes Kristallisat von 0,64 g wurde durch weiteres Einengen der Mutterlauge auf etwa 40 ml gewonnen (5,5 %). Sein Schmelzpunkt lag bei 184° (Zersetzung).

Insgesamt ergaben die Kristallisate 8,98 g kristallisiertes Rohphosphat = 90,5 % der Theorie. Das Produkt konnte aus 90 %igem Äthanol 1 : 15 umgelöst werden.

Fraktion 2: Isolierung von Ergotaminin und Ergocristinin.

1 g des Abdampfrückstandes von Fraktion 2 wurde in 50 ml Methanol eine halbe Stunde am Rückflußkühler unter Durchleiten von Stickstoff erhitzt. Nach dem Erkalten kristallisierten 0,42 g einer farblosen Substanz aus, die nach Kristallform und Schmelzpunkt von 242° (Zersetzung) als Ergotaminin identifiziert werden konnte. Aus der Mutterlauge wurden 0,43 g Ergocristinin als farblose, zugespitzte Prismen mit dem Schmelzpunkt 227° (Zersetzung) gewonnen.

0,1 g davon wurden in 1,8 ml 90 %igem Äthanol heiß gelöst und mit 0,1 ml alkoholischer Phosphorsäure (15 % H_3PO_4) versetzt. Nach 10-minütigem Erhitzen am Rückflußkühler wurde die Lösung zur Kristallisation abgekühlt. Unter dem Mikroskop konnten die typischen 6-eckigen Blättchen des Ergocristinphosphats beobachtet werden.

Fraktion 3:

a) Isolierung von Ergotaminin.

4 g des Abdampfrückstandes aus Fraktion 3 wurden in 200 ml Methanol 30 Minuten unter Stickstoff am Rückflußkühler erhitzt. Beim Erkalten der Lösung schied sich Ergotaminin kristallin ab. Nach dem Absaugen und Trocknen wurden etwa 2 g Ergotaminin mit dem Schmelzpunkt von 243° (Zersetzung) erhalten. Bei längerem Stehen der Mutterlauge

kristallisierten weitere 0,43 g unreines Ergotaminin. Aus der dunkelgrünen Mutterlauge konnten durch Kristallisation auf dem Objektträger noch die typischen dreieckigen Prismen des Ergotaminins beobachtet werden.

Die Gesamtausbeute an kristallisiertem Ergotaminin betrug 2,43 g (61 %).

b) Isolierung von Ergotamin und Ergotaminin.

1 g Rückstand aus Fraktion 3 wurde in 7 ml Aceton gelöst. Die Lösung wurde filtriert und mit 0,7 ml Wasser versetzt. Sogleich bildeten sich die stark lichtbrechenden Prismen der Ergotamin-Aceton-Wasser-Verbindung. Nach dem Absaugen und Trocknen wog die Substanz 0,3 g und zeigte den für diese Verbindung typischen Schmelzpunkt von 180° (Zersetzung).

Die Mutterlauge wurde im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in 40 ml Methanol suspendiert und 30 Minuten am Rückflußkühler unter Durchleiten von Stickstoff zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde das ausgefallene Ergotaminin abgesaugt und getrocknet. Die Ausbeute an reinem Ergotaminin betrug 0,62 g. Die Substanz zeigte den Schmelzpunkt von 243° (Zersetzung).

Die Gesamtausbeute an kristallisierter Substanz betrug somit 0,92 g.

Präparative Aufarbeitung von Anbaumutterkorn
aus dem Klon X stammend.

5 kg dieses Mutterkorns wurden während 24 Stunden im Tiefkühlschrank auf -30° gekühlt. Nachdem das Gut gemahlen worden war, wurde aus einer Probe mit Hilfe der Weinsäuremethode der Gesamt-Alkaloidgehalt bestimmt. Er betrug, als Ergotamin berechnet, 0,80 % und entsprach somit 40 g Ergotamin. Die gemahlene Droge wurde mit 3 Litern eines Gemisches aus 60 Teilen Methanol, 2 Teilen Weinsäure und 38 Teilen Wasser übergossen und nach gutem Mischen 2 Stun=

den stehen gelassen. Anschließend wurde die durchfeuchtete Droge gleichmäßig auf 5 Perkulationsröhren verteilt und darin etwa 8 Stunden belassen. Die Maße der Perkulationsröhren betrugen an Höhe 100 cm und an lichter Weite 7,5 cm. Durch einen angeschmolzenen Hahn konnte die anschließende Perkolation derart geregelt werden, daß innerhalb von 2 Stunden von jeder Röhre etwa 1 Liter Perkolat abfloß. Nachdem 6 Liter der oben angegebenen Perkulationslösung jedes Rohr durchlaufen hatten, wurde der Rest des Perkolates mit Wasser herausgedrückt.

Die vereinigten Perkolate wurden durch Versetzen mit 450 ml 25 %iger Ammoniaklösung auf ein P_H von etwa 8 gebracht. Hierbei bildete sich ein Niederschlag. Man ließ ihn absitzen und trennte ihn dann von der Lösung durch Filtration. Er wog nach dem Trocknen 41,5 g. Er wurde in 415 ml Methylenchlorid dispergiert und 1 Stunde lang gerührt. Nach der Filtration wurde dieses Methylenchlorid mit zur folgenden Ausschüttelung verwendet.

Das Filtrat wurde zweimal mit je 6 Litern Methylenchlorid und einmal mit 3 Litern Methylacetat ausgeschüttelt. Die Ausschüttelungen wurden vereinigt, im Vakuum unter Durchleiten von Stickstoff auf ein Volumen von etwa 50 ml eingedampft und anschließend im Vakuum-Trockenschrank völlig zur Trockne eingedunstet. Der hierbei erhaltene Rückstand wog 34,2 g. Sein Alkaloidgehalt betrug nach der Weinsäuremethode 86 %, was einer Alkaloidmenge von 29,4 g Ergotamin entsprach. Von diesem Rückstand wurden 32 g (im Blauwert = 27,3 g Ergotamin) in 130 ml Methylenchlorid gelöst und über 600 g Aluminiumoxyd nach Brockmann chromatographiert. Die Säule besaß eine Höhe von 38 cm und einen Durchmesser von 5 cm. Die hierbei erhaltenen Fraktionen sind in folgender Tabelle zusammengefaßt: (siehe Tab.9)

Die einzelnen Fraktionen wurden zur Trockne gedunstet und wie folgt weiter verarbeitet.

Tab.9 :

Fraktion	ml	Kristallbild	Blauwert (als Ergo- tamin)	%
1	249	Ergocristinin + Ergocristin	14,3 g	52,5
2	74	Ergocristin + Ergotaminin	1,59 g	5,8
3	350	Ergotaminin + Ergotamin	4,7 g	17,2
4	1610	direkt nicht kristall- sierbare Alkaloide (Ergotamin + Ergometrin)	2,96 g	10,8
Insgesamt:			23,55 g	86,3
=====				

Fraktion 1:

a) Darstellung von Ergocristinphosphat.

5 g des Abdampfrückstandes aus Fraktion 1 wurden in 25 ml Methylenchlorid gelöst und mit 5 ml alkoholischer Phosphorsäure (15 % H_3PO_4) versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zugabe von 10 ml Methanol wieder in Lösung gebracht und diese eine halbe Stunde am Rückflußkühler unter Stickstoffatmosphäre im Sieden gehalten. Die Lösung wurde zum Abdunsten in eine Kristallisierschale gegeben. Zunächst wurden 2 g hellbräunlich gefärbtes Salz mit dem Schmelzpunkt 183° (Zersetzung) erhalten. Bei weiterem Einengen der Mutterlauge wurden etwa 4 g bräunliches Phosphat gewonnen, welches den Schmelzpunkt 182° (Zersetzung) zeigte. Beide Rohphosphate ergaben aus 90 %igem Äthanol umgelöst die typischen 6-eckigen Blättchen des Ergocristinphosphats in reiner, weißer Form. Der Schmelzpunkt lag bei $185-86^\circ$ (Zersetzung).

Die vereinigten Mutterlaugen ergaben nach dem Einengen etwa 3,3 braunes Phosphat, welches nach dem Umkristalli-

sieren auf dem Objektträger die charakteristischen Formen des Ergocristinphosphats zeigte. Der Schmelzpunkt betrug 186° (Zersetzung).

b) Darstellung von Ergocristinin.

5 g Alkaloidgemisch aus Fraktion 1 wurden in 300 ml 90 %igem Methanol sowie einigen Tropfen Eisessig eine halbe Stunde unter Stickstoffatmosphäre am Rückflußkühler erhitzt. Nach dem Abkühlen im Eisschrank konnten 2,8 g (56 %) farblose Prismen von Ergocristinin abgesaugt werden. Der Schmelzpunkt der Substanz lag bei 225° (Zersetzung). Aus der Mutterlauge kristallisierten noch 1,31 g weniger reines Produkt (26 %).

Die Mutterlauge ergab bei weiterem Einengen ein drittes unreines Kristallisat von etwa 0,5 g. Unter dem Mikroskop erhielt man die langen zugespitzten Prismen des Ergocristinins. Die Substanz zeigte den Schmelzpunkt von 220° (Zersetzung). Somit fielen etwa 92 % der Theorie an Ergocristinin an.

Fraktion 2: Isolierung von Ergotaminin und Ergocristinin.

1,59 g des Abdampfrückstandes von Fraktion 2 wurden in 30 ml 90 %igem Methanol unter Zugabe von einigen Tropfen Eisessig eine halbe Stunde unter Stickstoff am Rückflußkühler erhitzt. Nach dem Abkühlen und Absaugen konnte ein erstes Kristallisat von 0,4 g Ergotaminin in Form von dreieckigen Prismen gewonnen werden. Der Schmelzpunkt lag bei $242-43^{\circ}$ (Zersetzung). Aus der Mutterlauge wurden als zweites Kristallisat die langen Prismen des Ergocristinins erhalten. Die Ausbeute betrug 1 g. Die Substanz zeigte einen Schmelzpunkt von 225° (Zersetzung).

Die Gesamtausbeute an kristallisierter Substanz betrug 1,4 g (88 %).

Fraktion 3: Isolierung von Ergotaminin.

4,3 g des Alkaloidgemisches aus Fraktion 3 wurden in

100 ml 90 %igem Methanol eine halbe Stunde am Rückflußkühler unter Stickstoffatmosphäre erhitzt. Nach dem Erkalten wurden 1,37 g Ergotaminin abgesaugt (32 %). Die Substanz zeigte die charakteristischen dreieckigen Prismen des Ergotaminins; ihr Schmelzpunkt lag bei 243° (Zersetzung).

Nach dem Einengen der Mutterlauge konnten noch 1,21 g Ergotaminin gewonnen werden, dessen Schmelzpunkt bei $240-44^{\circ}$ (Zersetzung) lag (28 %). Die Mutterlauge konnte nicht mehr weiter kristallisiert werden. Auf dem Objektträger bildeten sich jedoch noch die typischen Prismen des Ergotaminins.

Die Gesamtausbeute an kristallisierter Substanz betrug 2,58 g (60 %).

Präparative Aufarbeitung von Mutterkorn
einer fast nur Ergotamin produzierenden Type.

5 kg dieser Droge wurden 24 Stunden lang im Tiefkühlschrank auf -30° gekühlt. Nach dem Mahlen wurde aus einer Probe mit Hilfe der Weinsäuremethode der Alkaloidgehalt bestimmt. Er betrug, als Ergotamin berechnet, 0,32 % und entsprach somit 16 g Ergotamin in der gesamten Drogenmenge. Die Droge wurde nun mit 3 Litern eines Gemisches übergossen, welches aus 60 Teilen Methanol, 2 Teilen Weinsäure und 38 Teilen Wasser bestand. Nach gutem Durchmischen des Ansatzes und 2-stündigem Stehenlassen wurde die durchfeuchtete Droge gleichmäßig auf 5 Perkulationsröhren verteilt, welche 100 cm hoch und 7,5 cm weit waren. Nachdem das Gemisch 8 Stunden darin belassen worden war, wurde die anschließende Perkulation derart geregelt, daß innerhalb von 2 Stunden von jeder Röhre etwa 1 Liter Perkolat gewonnen wurde. Nachdem 6 Liter der oben angegebenen Lösung jedes Rohr passiert hatten, wurde der Rest des Perkolates mit Wasser herausgedrückt.

Die Perkolate wurden vereinigt und durch Zugabe von 450 ml 25 %iger Ammoniakflüssigkeit auf ein P_H von etwa 8 eingestellt. Der sich hierbei bildende Niederschlag wog nach dem Filtrieren und Trocknen 45 g. Er wurde mit 450 ml Methylenchlorid unter Rühren extrahiert und die filtrierte Methylenchloridlösung mit zur anschließenden Ausschüttelung verwandt.

Das Filtrat wurde zweimal mit je 6 Litern Methylenchlorid und anschließend mit 3 Litern Methylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten Ausschüttelungen wurden im Vakuum unter Durchleiten von Stickstoff auf ein Volumen von etwa 50 ml eingeeengt und darauf im Vakuum-Trockenschrank endgültig zur Trockne gebracht. Der bräunlich gefärbte Rückstand wog 43 g. Die Bestimmung des Alkaloidgehaltes mit Hilfe der Weinsäuremethode ergab einen Gehalt von 26,5 %, berechnet als Ergotamin. Dieser Gehalt entsprach einer Alkaloidmenge von 11,4 g Ergotamin.

Der Extrakt wurde in 200 ml Methylenchlorid gelöst und über 500 g Aluminiumoxyd nach Brockmann chromatographiert. Die Säule hatte eine Höhe von 35 cm und eine lichte Weite von 5 cm. Beim Einengen des mit Methylenchlorid gewonnenen Eluats schied sich ein Kristallisat ab. Die Kristalle zeigten einen Schmelzpunkt von 180-81° (Zersetzung). Bei völligem Eindampfen der Methylenchloridlösung wurden 11 g dieser Substanz erhalten. Mit Hilfe der Weinsäuremethode wurden bei der Bestimmung des Blauwertes 97,3 % bzw. 10,7 g Alkaloid, berechnet als Ergotamin, gefunden.

Diese Substanz wurde ein zweites Mal nach Lösen in etwa 500 ml Methylenchlorid über 500 g Aluminiumoxyd nach Brockmann chromatographiert. Beim Einengen des Methylenchlorideluates konnten nunmehr 9,5 g rohes Kristallisat isoliert werden.

Vorversuche zur Reinigung des Rohkristallisates.

a) Umkristallisation aus Benzol:

0,5 g Rohkristallisat wurden in 10 ml Benzol heiß gelöst. Beim Erkalten schieden sich 0,29 g farblose Kristalle ab, die die Form 6-eckiger, langer Prismen aufwiesen. Der Schmelzpunkt der Substanz lag bei 180-81° (Zersetzung) und wies somit auf das Vorliegen von Sensibamin hin.

Polarisation der umgelösten Substanz:

50 mg Substanz in 5 ml Chloroform (l = 1 dm)

$$\alpha_D^{20} = +1,21^\circ; \quad [\alpha]_D^{20} = +121^\circ.$$

b) Umkristallisation aus wässrigem Aceton:

1 g Rohkristallisat wurde in 7,5 ml Aceton kalt gelöst und mit 0,8 ml Wasser versetzt. Es fielen 0,2 g weißes Kristallisat aus. Die Substanz bestand aus dreieckigen, klaren Prismen, welche den Schmelzpunkt von 242° (Zersetzung) aufwiesen.

Die Aceton-Mutterlauge wurde abgedunstet, der Rückstand mit 40 ml 90 %igem Methanol aufgenommen, 0,08 ml Eisessig zugefügt und 5 Minuten lang gekocht. Nach dem Erkalten wurden 0,685 g Ergotaminin abgesaugt. Der Schmelzpunkt dieser Substanz betrug 241-44° (Zersetzung).

Die Gesamtausbeute an reinem Ergotaminin betrug 0,885 g.

Kristallisation von Sensibamin.

8 g Rohsensibamin wurden in 160 ml Benzol heiß gelöst. Nach dem Erkalten wurde das auskristallisierte Sensibamin abgesaugt und wog nach dem Trocknen 6,35 g (82 %). Diese Substanz wurde ein zweites Mal aus 200 ml Benzol umgelöst und ergab nunmehr ein reines Sensibamin. Die Ausbeute betrug 4,37 g. Der Schmelzpunkt wurde bei 180° (Zersetzung) gefunden.

Polarisation von Sensibamin:

50 mg Substanz in 5 ml Chloroform (l = 1 dm)

$$\alpha_D^{20} = +1,25^\circ; \quad [\alpha]_D^{20} = +125^\circ.$$

Umwandlung von Sensibamin in Ergotaminin.

1 g reinstes Sensibamin wurde in 50 ml Methanol mit 0,25 % Eisessig kurz aufgekocht. In einer Kristallisierschale wurde die Lösung erkalten lassen. Das hierbei erhaltene farblose Kristallisat wurde abgesaugt und wog nach dem Trocknen 0,6 g. Der Schmelzpunkt der Substanz lag bei 242° (Zersetzung).

Polarisation von Ergotaminin:

25 mg Substanz in 5 ml Chloroform (l = 1 dm)

$$\alpha_D^{20} = +1,82^\circ; \quad [\alpha]_D^{20} = +364^\circ.$$

Die Mutterlauge wurde auf etwa 25 ml eingedunstet. Nach dem Abkühlen konnte ein zweites Kristallisat im Gewicht von 0,12 g gewonnen werden. Der Schmelzpunkt wurde zu 244° (Zersetzung) gefunden.

Das in der Mutterlauge verbliebene Alkaloid kristallisiert beim weiteren Einengen ebenfalls in den typischen Prismen des Ergotaminins, ist jedoch gelb gefärbt.

Die Gesamtausbeute an kristallinem Ergotaminin betrug etwa 80 %.

Umwandlung von Ergotaminin in Ergotaminphosphat.

1 g des nach vorstehendem Abschnitt gewonnenen reinsten Ergotaminins wurde in 100 ml Methylenchlorid gelöst und mit 1 ml alkoholischer Phosphorsäure (15 %ig) versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zugabe von 20 ml Methanol wieder in Lösung gebracht. Das Gemisch wurde eine halbe Stunde unter Stickstoffatmosphäre am Rückflußkühler erhitzt. Nach dem Abkühlen konnten 0,54 g kristallisiertes Ergotaminphosphat abgesaugt werden (46 % der Theorie). Der Schmelzpunkt dieser Substanz lag bei

195° (Zersetzung).

Die Mutterlauge wurde zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 15 ml 96 %igem Äthanol heiß gelöst und bis zur beginnenden Trübung mit Äther versetzt. Nach längerem Stehen wurden 0,5 g (43 %) Rohphosphat gewonnen. Der Schmelzpunkt dieses Rohphosphates wurde bei 192° (Zersetzung) gefunden.

Die Gesamtausbeute an kristallisiertem Ergotaminphosphat betrug 89 %.

Eine Probe dieses Salzes ergab nach dem Umlösen aus der 30-fachen Menge 90 %igem Äthanol farblose Kristalle, welche die charakteristische Faßform des Ergotaminphosphats aufwiesen. Die Substanz zeigte den Schmelzpunkt von 200° (Zersetzung).

Umwandlung von Ergotaminin in Ergotaminsulfat.

0,88 g reinstes Ergotaminin wurden in 1,5 ml Eisessig durch vorsichtiges Erwärmen gelöst und mit 7,5 ml methanolischer Schwefelsäure (1 %ig) versetzt. Nach längerem Stehen im Eisschrank kristallisierten als erste Fraktion 0,34 g des Salzes aus (36 %). Beim weiteren Einengen der Mutterlauge konnten als zweite Fraktion noch 0,2 g (21 %) und als dritte Fraktion 0,31 g (33 %) abgesaugt werden. Die Schmelzpunkte aller drei Kristallisate lagen bei 205° (Zersetzung).

Die Gesamtausbeute an kristallisiertem Ergotaminsulfat betrug 90 %. Durch nochmaliges Umkristallisieren aus der 70-fachen Menge 80 %igen Methanols änderte sich der Schmelzpunkt nicht mehr.

Quantitative Bestimmung von "Secale concentratum Stada".

a) Quantitative Bestimmung der wasserunlöslichen Alkaloide.

Das "Secale concentratum Stada" wurde mit Hilfe der Weinsäuremethode auf seinen Alkaloidgehalt geprüft, welcher zu

10 %, berechnet als Ergotamin, gefunden wurde.

50 g "Secale concentratum Stada" wurden in einem Becherglas von 250 ml mit 80 ml Methylenchlorid übergossen und 5 Minuten unter öfterem Umrühren stehen gelassen. Danach wurde vom Milchezucker abfiltriert und dieser auf dem Filter noch zweimal mit je 30 ml Methylenchlorid nachgewaschen. Das Filtrat, welches die gesamten Alkaloide des Extraktes enthielt, wurde auf dem Wasserbad unter Darübleiten von Stickstoff auf etwa 10 ml abgedunstet und über 125 g Aluminiumoxyd nach Brockmann chromatographiert. Die Säule war 17 cm hoch und hatte einen Durchmesser von 3 cm. Mit dem gleichen Lösungsmittel wurde eluiert. Es wurden folgende Fraktionen erhalten:

Tab.10 :

Fraktion	ml	Aussehen	Kristallbild	Blauwert in mg	%	Gewicht	%
1	3,2	gelb	Ergocristinin + Ergocristin	90	1,8	100	2
2	101,0	gelb	Ergocristin	3640	73,0	3750	75
3	920,0	hellgelb	Ergotamin	860	17,0	1100	22
Insgesamt:				4590	91,8	4950	99
=====							

Das Aluminiumoxyd wurde aus der Säule herausgestoßen. Eine unter der UV-Lampe hellblau fluoreszierende Zone von 3,5 cm Breite, die sich 4 cm unter dem oberen Rand des Aluminiumoxyds zeigte, wurde herausgeschnitten und in einem Becherglas mit 50 ml Methanol ausgezogen. Aus dem methanolischen Filtrat wurden 0,1 ml entnommen und auf ein Rundfilter (Schleicher und Schüll Nr. 2043 b, 11 cm Durchmesser) aufgetragen. Nach der Entwicklung des Rundfilter-Papierchromatogramms mit Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch im Verhältnis 4 : 1 : 5 zeigte sich unter der UV-Lampe ein schön hellblau fluoreszierender Ring mit dem R_F -Wert 0,71.

Die Bestimmung des Blauwertes der einzelnen Fraktionen.

Fraktion 1:

1 ml aus der Fraktion 1 wurde im Reagensglas auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft. Dieser Rückstand wurde in 1 ml Eisessig gelöst und mit 9 ml 1 %iger wässriger Weinsäurelösung versetzt. Von dieser Lösung wurde 1 ml mit 49 ml 1 %iger wässriger Weinsäurelösung verdünnt. Dieser Verdünnung wurden 2 ml entnommen und mit 4 ml Reagens nach van Urk vermischt. Nach 15-minütigem Stehen wurde der Blauwert im Photometer (ELKO 11 von Zeiss-Opton, Filter S 57 E) gemessen. Die Durchlässigkeit wurde zu 35,5 % gefunden, welche nach der Eichkurve 56,4 % entspricht.

Berechnung:

$$56,4 \cdot 500 \cdot 3,2 = 90 \text{ mg};$$

(= abgelesener Wert • Verdünnung • Anzahl ml der Fraktion).

Fraktion 2:

1 ml aus der Fraktion 2 wurde wie oben angegeben eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Eisessig gelöst und mit 9 ml 1 %iger Weinsäurelösung versetzt. Von dieser Lösung wurde 1 ml mit 99 ml obiger Weinsäurelösung verdünnt. 2 ml dieser Verdünnung wurden mit 4 ml Reagens nach van Urk vermischt. Die Durchlässigkeit dieser Lösung betrug 51,75 % und entsprach 36 %.

Berechnung:

$$36 \cdot 1000 \cdot 101 = 3640 \text{ mg};$$

(= abgelesener Wert • Verdünnung • Anzahl ml der Fraktion).

Fraktion 3:

1 ml aus der Fraktion 3 wurde wie oben angegeben eingedampft. Dieser Rückstand wurde in 1 ml Eisessig gelöst und mit 9 ml 1 %iger wässriger Weinsäurelösung versetzt. Von dieser Lösung wurde 1 ml mit 1 ml obiger Weinsäurelösung verdünnt und mit 4 ml Reagens nach van Urk vermischt. Die Durchlässigkeit dieser Lösung betrug 41,9 % und entsprach

somit 46,98.

Berechnung:

$$46,9 \cdot 20 \cdot 920 = 860 \text{ mg;}$$

(= abgelesener Wert · Verdünnung · Anzahl ml der Fraktion)

b) Quantitative Bestimmung des Ergometrins.

1 g "Secale concentratum Stada" wurde analytisch gewogen und in einem Becherglas von 25 ml Inhalt mit 15 ml Eisessig übergossen und 5 Minuten unter öfterem Umrühren stehen gelassen. Danach wurde in einen 100 ml-Meßkolben filtriert und der auf dem Filter befindliche Milchzucker noch zweimal mit je 5 ml Eisessig nachgewaschen. Alsdann wurde mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Aus einer geeichten Pipette, die 68 Tropfen pro ml lieferte, wurden von dieser Lösung 7 bis 17 Tropfen auf Filtrierpapier (Schleicher und Schüll Nr. 2043 b, 58 mal 60 cm) 8 cm unter dem oberen Rand in Abständen von 5 zu 5 cm aufgetragen. Als Vergleichssubstanz wurden aus einer geeichten Pipette, die 84 Tropfen pro ml lieferte, 4 Tropfen Neo Gynergen-Lösung = 58 Ergometrin auf den Filtrierpapierbogen aufgebracht. Nach 15-stündigem absteigendem Chromatographieren mit Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch im Verhältnis 4 : 1 : 5 wurde das Papierchromatogramm getrocknet und im verdunkelten Raum im UV-Licht die Fluoreszenzintensität der Flecken mit den R_F -Werten 0,71 bis 0,73 verglichen. Die Intensität des Ergometrinfleckens der Neo Gynergen-Lösung zeigte sich farbgleich mit dem Ergometrinflecken, der sich aus dem mit 9 Tropfen der Extraktlösung beschickten Startpunkt entwickelt hatte.

Berechnung:

$$9 \text{ Tropfen} = 58 \text{ Ergometrin}$$

$$X = \frac{5 \cdot 68}{9 \cdot 100} ; \quad X = 0,38 \% \text{ Ergometrin.}$$

Die Analysenwerte der Tabellen 11 und 12 wurden mit Hilfe der Weinsäuremethode ermittelt und als Ergotamin berechnet. Diese Methode sei an einem Beispiel eines Sklerotiums, aus dem Anbau des Klons X stammend, erläutert:

1 Sklerotium mit einem Gewicht von 240 mg wurde halbiert. Die eine Hälfte wurde mit dem Skalpell fein geschnitzelt und die Spänchen im glatten Porzellanmörser pulverisiert. Von dem Drogenpulver wurden 100 mg genau gewogen und in einem Reagensglas mit 10 ml einer 30 %igen wässrigen Weinsäurelösung versetzt. Das Gemisch wurde unter öfterem Umrühren mit einem Glasstab 4 Stunden stehen gelassen. Nach der Filtration durch ein Rundfilter (Schleicher und Schüll Nr. 595, 7 cm Durchmesser) wurde 1 ml des Filtrats in einem Reagensglas mit 1 ml Wasser und 4 ml Reagens nach van Urk vermischt. Nach 15-minütigem Stehen wurde der Blauwert dieser Lösung im Photometer (ELKO 11 von Zeiss-Opton, Filter S 57 E) gemessen. Die Durchlässigkeit wurde zu 39,0 % gefunden, welche nach der Eichkurve 51 % entspricht.

Berechnung:

$$\frac{51 \cdot 2 \cdot 10 \cdot 100}{100} = 1,02 \% ;$$

$$(\frac{\text{abgelesener Wert} \cdot \text{Verdünnung} \cdot \text{Anzahl ml des Auszugs} \cdot 100}{\text{Einwaage}}).$$

Tab.11 : Einzelanalysen der Droge B,
Ernte 1952.

Lfd. Nr.	Ges.Gew. in mg	Einwaage in mg	Alkaloidgehalt in %
1	350	100,0	1,11
2	350	100,0	1,08
3	320	100,0	1,33
4	250	99,0	0,96
5	250	100,0	1,05
6	350	100,0	0,90
7	300	100,0	1,16
8	310	100,0	1,11
9	330	100,0	1,15
10	250	100,0	1,01
11	350	100,0	0,84
12	380	100,0	0,85
13	250	81,8	0,624
14	270	88,6	1,09
15	350	100,0	0,796
16	250	100,0	0,88
17	250	100,0	0,68
18	270	100,0	1,09
19	270	100,0	1,03
20	270	100,0	1,10
21	250	100,0	0,936
22	250	100,0	1,00
23	260	100,0	0,630
24	250	100,0	1,03
25	280	100,0	0,94
26	260	100,0	0,70
27	250	96,6	0,878
28	320	100,0	0,84
29	300	100,0	0,75
30	350	96,2	1,19
31	570	100,0	0,85
32	550	100,0	0,80

Lfd. Nr.	Ges.Gew. in mg	Einwaage in mg	Alkaloidgehalt in %
33	540	100,0	0,83
34	530	100,0	0,94
35	530	100,0	0,896
36	540	100,0	0,570
37	480	100,0	0,450
38	480	100,0	0,756
39	390	100,0	0,950
40	380	100,0	0,760
41	420	98,8	0,988
42	430	100,0	0,750
43	400	100,0	0,565
44	400	100,0	1,025
45	380	100,0	1,055
46	300	100,0	0,820
47	340	100,0	0,945
48	310	100,0	0,925
49	330	100,0	0,650
50	300	97,8	0,768
51	310	94,8	1,057
52	320	100,0	0,91
53	380	100,0	0,80
54	320	95,4	0,675
55	290	100,0	0,505
56	290	100,0	0,770
57	300	100,0	0,86
58	280	97,0	0,70
59	290	100,0	0,965
60	300	97,4	0,725
61	400	71,8	1,05
62	430	100,0	0,63
63	390	97,2	1,085
64	390	100,0	0,825
65	420	100,0	0,755

Lfd. Nr.	Ges.Gew. in mg	Einwaage in mg	Alkaloidgehalt in %
66	380	93,8	0,816
67	400	100,0	0,835
68	380	100,0	0,645
69	400	100,0	1,11
70	380	100,0	1,10
71	340	100,0	0,93
72	330	100,0	0,320
73	340	100,0	1,09
74	340	100,0	1,01
75	330	84,6	1,042
76	350	100,0	1,125
77	340	100,0	0,64
78	410	100,0	1,22
79	370	100,0	0,98
80	340	89,8	0,725
81	300	66,2	0,764
82	290	75,6	0,641
83	300	77,2	1,01
84	320	97,2	1,09
85	320	100,0	0,87
86	290	94,8	0,498
87	300	100,0	0,740
88	320	92,6	0,82
89	320	100,0	1,075
90	280	72,0	1,11
91	310	67,0	0,820
92	290	51,2	0,818
93	300	95,6	0,721
94	300	100,0	1,20
95	280	94,6	0,970
96	300	100,0	1,015
97	310	100,0	0,81
98	320	98,2	0,82

Lfd. Nr.	Ges.Gew. in mg	Einwaage in mg	Alkaloidgehalt in %
99	290	99,2	0,91
100	300	100,0	1,01
101	320	100,0	1,195
102	300	78,0	0,575
103	300	100,0	0,595
104	310	100,0	1,01
105	300	76,8	0,664
106	310	87,0	0,688
107	310	100,0	0,79
108	310	94,2	0,642
109	300	91,8	0,738
110	300	100,0	0,860
111	300	67,8	0,95
112	320	85,4	0,855
113	330	100,0	0,67
114	300	100,0	1,15
115	300	100,0	0,660
116	310	100,0	0,770
117	300	83,2	0,708
118	320	100,0	0,695
119	310	100,0	0,725
120	300	100,0	0,665
121	300	83,8	0,574
122	290	100,0	1,21
123	290	100,0	1,065
124	290	100,0	0,625
125	290	100,0	1,068
126	310	100,0	1,19
127	300	100,0	1,22
128	280	86,6	0,849
129	290	90,2	0,594
130	300	100,0	0,910
131	290	100,0	0,970

Lfd. Nr.	Ges.Gew. in mg	Einwaage in mg	Alkaloidgehalt in %
132	280	100,0	0,640
133	290	100,0	0,865
134	280	100,0	0,720
135	300	95,6	1,072
136	290	96,8	0,922
137	290	97,0	0,546
138	300	100,0	0,835
139	270	100,0	1,32
140	310	100,0	0,91
141	290	94,0	0,842
142	290	100,0	0,985
143	300	100,0	1,025
144	270	74,2	0,726
145	280	79,0	0,586
146	280	100,0	0,585
147	320	100,0	0,960
148	250	93,2	1,042
149	300	100,0	1,01
150	300	100,0	0,720
151	280	68,4	1,352
152	300	78,0	0,950
153	300	85,4	0,732
154	300	100,0	1,092
155	280	100,0	1,20
156	300	93,2	1,048
157	300	97,8	1,195
158	300	100,0	1,36
159	290	100,0	0,955
160	300	100,0	0,860
161	350	100,0	1,035
162	300	87,8	0,765
163	420	98,2	1,030
164	320	100,0	0,76

Lfd. Nr.	Ges.Gew. in mg	Einwaage in mg	Alkaloidgehalt in %
165	400	93,2	1,24
166	300	84,4	0,688
167	320	95,2	1,028
168	300	96,0	1,23
169	320	73,2	1,085
170	470	100,0	1,025
171	320	89,2	1,148
172	450	100,0	1,075
173	500	100,0	0,985
174	300	100,0	0,980
175	320	100,0	0,950
176	300	100,0	0,955
177	300	100,0	1,31
178	300	100,0	0,665
179	320	100,0	1,300
180	300	73,2	1,160
181	400	100,0	1,045
182	320	100,0	0,960
183	400	100,0	1,030
184	470	100,0	1,23
185	300	100,0	1,07
186	400	100,0	0,955
187	400	96,4	1,10
188	300	88,2	1,078
189	300	81,0	0,845
190	400	100,0	1,24
191	420	100,0	0,81
192	450	100,0	0,97
193	420	100,0	0,83
194	350	100,0	0,705
195	470	100,0	0,665
196	300	100,0	0,965
197	300	100,0	1,27
198	300	100,0	1,11

Lfd. Nr.	Ges.Gew. in mg	Einwaage in mg	Alkaloidgehalt in %
199	300	100,0	1,015
200	300	100,0	1,07
201	320	100,0	0,88
202	300	100,0	1,20
203	720	100,0	0,71
204	450	100,0	0,965
205	470	100,0	1,025
206	370	100,0	0,88
207	520	100,0	1,16
208	300	100,0	0,98
209	320	100,0	1,21
210	320	100,0	1,04
211	400	100,0	1,085
212	420	100,0	0,830
213	500	100,0	0,925
214	350	100,0	1,30
215	330	100,0	1,055
216	470	100,0	0,85
217	400	96,6	0,839
218	360	100,0	0,625
219	390	100,0	1,29
220	300	100,0	1,015
221	300	97,4	0,751
222	470	100,0	0,41
223	350	100,0	1,01
224	300	91,2	1,072
225	400	100,0	1,025
226	350	100,0	1,42
227	330	100,0	1,06
228	300	100,0	1,28
229	310	100,0	1,44
230	320	100,0	1,25
231	300	100,0	1,045
232	300	90,4	0,956

Lfd. Nr.	Ges.Gew. in mg	Einwaage in mg	Alkaloidgehalt in %
233	300	100,0	0,735
234	320	98,2	1,01
235	370	100,0	1,06
236	320	100,0	0,965
237	370	100,0	0,720
238	350	100,0	0,465
239	350	100,0	1,20
240	350	100,0	1,06
241	300	100,0	1,05
242	320	100,0	0,555
243	350	100,0	1,08
244	370	100,0	1,22
245	300	100,0	1,18
246	300	100,0	0,890
247	300	63,2	1,258
248	300	100,0	0,875
249	300	100,0	1,320
250	300	100,0	1,29
251	300	80,6	1,19
252	400	100,0	0,794
253	300	80,0	1,27
254	350	95,2	0,899
255	300	100,0	0,915
256	400	87,2	0,798
257	320	100,0	0,965
258	300	77,0	1,138
259	300	100,0	0,935
260	300	80,8	0,905
261	280	100,0	0,735
262	330	100,0	0,725
263	310	100,0	0,935
264	290	100,0	0,770
265	300	100,0	0,840
266	370	100,0	0,980

Lfd. Nr.	Ges.Gew. in mg	Einwaage in mg	Alkaloidgehalt in %
267	300	100,0	1,05
268	310	90,2	0,608
269	300	89,4	0,968
270	300	77,0	1,01
271	300	100,0	1,055
272	300	100,0	1,38
273	320	98,6	0,526
274	320	86,6	0,952
275	310	97,4	0,826
276	370	100,0	1,05
277	320	100,0	1,36
278	300	100,0	0,975
279	300	100,0	0,810
280	320	100,0	0,895
281	300	100,0	0,940
282	300	83,6	1,035
283	300	100,0	0,940
284	300	73,6	1,29
285	300	86,2	1,272
286	320	63,0	0,785
287	350	100,0	1,085
288	300	100,0	1,065
289	300	100,0	1,09
290	300	91,0	1,068
291	370	98,2	1,29
292	320	100,0	0,92
293	300	100,0	0,99
294	350	100,0	1,295
295	300	100,0	0,89
296	300	100,0	0,915
297	300	100,0	1,06
298	300	100,0	0,885
299	370	100,0	0,645
300	300	100,0	1,30

Tab.12 : Einzelanalysen der Kultur Klon X.

Lfd. Nr.	Ges.Gew. in mg	Einwaage in mg	Alkaloidgehalt in %
1	400	100,0	1,07
2	380	100,0	1,27
3	350	100,0	1,09
4	350	100,0	1,29
5	350	100,0	1,20
6	350	100,0	1,00
7	410	100,0	1,18
8	450	100,0	1,23
9	350	100,0	1,26
10	350	100,0	1,09
11	270	100,0	1,11
12	320	100,0	1,03
13	330	100,0	0,92
14	290	100,0	1,21
15	300	100,0	1,23
16	320	100,0	1,05
17	300	100,0	1,04
18	300	100,0	1,15
19	270	100,0	0,68
20	300	100,0	1,23
21	300	100,0	1,12
22	320	95,5	1,23
23	270	65,5	1,27
24	300	100,0	1,21
25	270	81,9	1,08
26	270	92,7	0,93
27	370	100,0	1,25
28	370	96,9	1,28
29	250	100,0	1,22
30	300	100,0	1,24
31	300	95,9	0,875
32	270	78,1	0,980
33	250	89,0	1,18

Lfd. Nr.	Ges.Gew. in mg	Einwaage in mg	Alkaloidgehalt in %
34	270	100,0	1,00
35	300	100,0	1,31
36	300	100,0	1,15
37	250	100,0	1,15
38	350	100,0	1,28
39	400	100,0	1,34
40	320	100,0	1,21
41	300	100,0	0,98
42	270	96,1	1,28
43	300	100,0	1,10
44	300	100,0	1,20
45	270	100,0	1,36
46	220	88,2	1,18
47	270	100,0	1,39
48	220	100,0	1,16
49	400	100,0	1,26
50	320	100,0	0,88
51	400	100,0	1,20
52	300	78,2	1,330
53	220	82,4	1,250
54	400	95,2	1,290
55	300	100,0	1,170
56	370	100,0	1,265
57	250	90,4	1,450
58	300	100,0	1,365
59	300	100,0	1,010
60	400	100,0	1,290
61	400	100,0	1,250
62	250	100,0	1,210
63	250	79,3	1,150
64	270	71,9	1,265
65	300	100,0	1,160
66	500	100,0	1,190

Lfd. Nr.	Ges.Gew. in mg	Einwaage in mg	Alkaloidgehalt in %
67	300	100,0	1,080
68	300	100,0	1,120
69	500	100,0	1,380
70	350	100,0	1,320
71	250	100,0	1,260
72	300	100,0	1,130
73	300	72,0	1,055
74	400	100,0	1,300
75	250	100,0	1,240
76	250	100,0	1,320
77	300	100,0	1,120
78	250	84,0	1,200
79	350	100,0	1,340
80	370	100,0	1,320
81	350	100,0	1,135
82	350	100,0	1,080
83	250	100,0	1,140
84	300	81,9	1,200
85	300	84,0	1,145
86	300	100,0	1,220
87	350	100,0	1,240
88	350	100,0	1,250
89	200	86,8	1,150
90	230	96,2	0,967
91	300	100,0	1,300
92	300	100,0	1,230
93	350	100,0	1,090
94	350	100,0	1,210
95	300	95,4	1,510
96	270	90,0	1,400
97	270	46,8	1,170
98	250	85,0	1,370
99	250	100,0	1,015

Lfd. Nr.	Ges.Gew. in mg	Einwaage in mg	Alkaloidgehalt in %
100	270	100,0	1,230
101	400	100,0	1,100
102	270	100,0	1,210
103	250	81,3	1,270
104	350	100,0	1,230
105	250	88,4	1,290
106	300	100,0	1,160
107	250	52,4	1,010
108	220	100,0	1,120
109	220	81,6	1,270
110	300	100,0	1,300
111	270	100,0	1,370
112	520	100,0	1,116
113	280	100,0	1,260
114	300	100,0	1,120
115	300	100,0	1,180
116	270	100,0	1,166
117	270	100,0	1,230
118	400	100,0	1,130
119	320	100,0	1,080
120	300	100,0	1,120
121	450	100,0	1,180
122	300	100,0	1,380
123	360	100,0	0,950
124	290	100,0	1,160
125	320	100,0	1,372
126	420	100,0	1,200
127	300	100,0	1,290
128	370	100,0	1,220
129	270	100,0	1,136
130	270	100,0	1,010
131	320	100,0	1,220
132	320	100,0	1,150

Lfd. Nr.	Ges.Gew. in mg	Einwaage in mg	Alkaloidgehalt in %
133	320	100,0	1,168
134	320	100,0	1,300
135	350	100,0	1,130
136	370	100,0	1,214
137	320	100,0	1,220
138	320	100,0	1,156
139	270	100,0	1,270
140	300	100,0	1,276
141	270	100,0	1,160
142	420	100,0	1,090
143	270	100,0	1,300
144	320	100,0	1,155
145	310	100,0	1,305
146	320	100,0	1,210
147	250	100,0	1,190
148	250	100,0	1,290
149	300	100,0	1,216
150	320	100,0	1,306
151	300	100,0	1,170
152	300	100,0	1,220
153	300	100,0	1,045
154	300	100,0	1,092
155	280	100,0	1,100
156	270	100,0	1,136
157	280	100,0	1,320
158	270	100,0	1,220
159	320	100,0	1,200
160	300	100,0	1,170
161	270	100,0	1,110
162	270	100,0	1,170
163	320	100,0	1,176
164	250	100,0	1,000
165	300	100,0	1,170
166	240	100,0	1,088

Lfd. Nr.	Ges.Gew. in mg	Einwaage in mg	Alkaloidgehalt in %
167	300	100,0	1,235
168	280	100,0	1,020
169	270	100,0	1,270
170	300	100,0	1,200
171	250	88,0	1,040
172	350	100,0	1,050
173	320	100,0	0,960
174	320	100,0	1,135
175	320	100,0	1,280
176	250	100,0	1,350
177	400	100,0	1,190
178	300	100,0	1,130
179	350	100,0	1,320
180	300	100,0	1,290
181	250	100,0	1,220
182	250	100,0	1,210
183	270	100,0	1,205
184	270	94,2	1,310
185	270	100,0	1,200
186	270	100,0	1,170
187	250	71,0	1,250
188	250	100,0	1,140
189	250	100,0	1,140
190	250	100,0	1,110
191	320	100,0	1,050
192	300	100,0	1,198
193	270	100,0	1,250
194	270	100,0	1,360
195	270	100,0	1,320
196	280	100,0	1,230
197	270	100,0	1,300
198	270	100,0	1,080
199	270	100,0	0,980
200	300	100,0	1,216

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s .

- (1) M. Field: Amer.J.Sc. Arts de Silliman
2, 359, (1825)
- (2) A. Schumacher: Emmération des Plantes de L'Ile
de Sjælland 2, 174, (1801)
- (3) M. De Candolle: Mém. du Mus. 2, 401, (1815)
- (4) M. L.-R. Tulasne: Ann.Sc.Nat. partie botan.
3.Sér. t. 20, (1853)
- (5) R. Stäger: Bot.Ztg. H. 6/7, 111, (1903)
- (6) G. Barger: Ergot and Ergotism. Gurney and Jackson.
London 1931
- (7) A. Rippel-Baldes: Grundriß der Mikrobiologie 2.Aufl.
Springer Verlag Berlin 1952
- (8) E. Gäumann: Pflanzliche Infektionslehre 2.Aufl.
Verlag Birkhäuser, Basel, 1951
- (9) H. Rochelmeyer: Pharmazie 4, 326, (1949)
- (10) E. Fischer u. E. Gäumann: Biologie der pflanzen=
bewohnenden parasitischen Pilze.
Gustav Fischer Jena 1929
- (11) V. Grasso: Le Claviceps delle Graminacee Italiane.
Estratto dagli Ann. della Sperimentazione
Agrar. Roma 1952
- (12) H. Kirchhoff: Zblatt f. Bakt. 2, 77, 310, (1929)
- (13) J. Krebs: Ber.Schw.Bot.Ges. 45, 71, (1936)
- (14) L. Hecke: Schw.Apoth.Ztg. 59, 277, (1921)
- (15) R. Falck: Pharm.Ztg. 67, 73, (1922)
- (16) N. v. Békesy: Biochem.Ztschr. 303, 368, (1940)
- (17) N. v. Békesy: Math.Naturw.Anz.
Ung.Akad.Wiss. 62, (1943)
- (18) F. Sobel: Diss. Mainz 1950
- (19) N. v. Békesy: Persönl. Mitt. an
Herrn Prof. Rochelmeyer 1948
- (20) A. Stoll: Naturwiss. 11, 697, (1923)
- (21) A. Stoll: Helv.Chim.Acta 28, 1283, (1945)
- (22) W. Küssner: E. Merck's Jhber. 47, 5, (1933)
- (23) K. Konrad: Diss. Mainz 1952
- (24) N. Pfennig: Arch.Mikrobiol. 18, 327, (1953)
- (25) W. Offenbächer: Diss. Mainz (in Vorbereitung)

- (26) G.E. Foster, J. Macdonald u. T.S.G. Jones:
J.Pharm.Pharmacol. 1, 802, (1949)
- (27) H. Brindle, J.E. Carless u. H.B. Woodhead:
J.Pharm.Pharmacol. 2, 793, (1951)
- (28) L. Fuchs u. M. Pöhm: Scient.Pharm. 19, 232, (1951)
- (29) A. Kofler: Arch.Pharm.Ber.Dtsch.Pharm.Ges.
274, 398, (1936)
- (30) L. Zechmeister u. L. v. Cholnoky:
Die chromatographische Adsorptions=
analyse 2.Aufl.
Jul. Springer. Wien 1938
- (31) A. Kofler: Angew.Chem. 52, 251, (1939)
- (32) L. Rutter: Nature 161, 435, (1948)

Lebenslauf.

Ich, Gerd Rudolf Kessler, wurde am 1. März 1923 als Sohn des Stadtamtmanns Ludwig Kessler und seiner Ehefrau Alma, geborene Schneider, zu Saarbrücken geboren. Nach vier Jahren Grundschule von 1929 bis 1933 besuchte ich das Realgymnasium zu Völklingen/Saar, welches ich im Jahre 1942 mit dem Reifezeugnis verließ. Nach Kriegseinsatz und Gefangenschaft trat ich im Herbst 1945 als Praktikant in die Engel-Apotheke in Völklingen ein und schloß die praktische Ausbildung 1947 mit dem pharmazeutischen Vorexamen mit dem Prädikat "gut" ab. Ich begann das pharmazeutische Studium zunächst im Wintersemester 1947/48 in Dijon und setzte es im Sommer 1948 an der Universität Mainz fort. Im Februar 1951 bestand ich die Pharmazeutische Prüfung mit "sehr gut". Anschließend wurde ich Hilfsassistent am Pharmazeutischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz und begann mit der Bearbeitung des vorliegenden Themas.

